

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA

CARRERA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

TEMA

**“Elaboración de un preparado hidrosoluble en forma de sólido
pulverulento a partir de *Ilex guayusa* Loes”**

AUTORES

Reinaldo Rigoberto Álvarez Castro

Sting Brayán Luna Fox

TUTOR

Dr. Matteo Radice

PUYO-ECUADOR

Febrero, 2020

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Reinaldo Rigoberto Álvarez Castro, con cédula de identidad 1600622995, y Sting Brayan Luna Fox, con cédula de identidad 75698651, declaramos que las actividades realizadas para la ejecución y culminación del presente proyecto de investigación y desarrollo, que tiene como tema **“ELABORACIÓN DE UN PREPARADO HIDROSOLUBLE EN FORMA DE SÓLIDO PULVERULENTO A PARTIR DE *ILEX GUAYUSA LOES*”**, se basaron en la búsqueda de información, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, que me guiaron para estructurar mi trabajo y sea considerado para posibles investigaciones futuras, basándose en los resultados obtenidos; además queda bajo nuestra responsabilidad en forma legal y académicamente como autores del presente trabajo previo a la obtención del título como Ingeniero Agroindustrial.

Autores

Reinaldo Rigoberto Álvarez Castro
CI. 1600622995

Sting Brayan Luna Fox
CI. 75698651

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Yo, **Matteo Radice** con CI: **175692885-7** y **Yasiel Arteaga Crespo** con CI: **1757016256**, alegamos que los señores **Reinaldo Rigoberto Álvarez Castro** y **Sting Brayan Luna Fox** egresados de la carrera Ingeniería Agroindustrial por la Universidad Estatal Amazónica, realizaron el proyecto trabajo de investigación que tiene como título: **“Elaboración de un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de *Ilex guayusa* Loes”**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial bajo nuestra supervisión.

Dr. Matteo Radice

Dr. Yasiel Arteaga Crespo



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND



Oficio No. 90-SAU-UEA-2020

Puyo, 29 de enero de 2020

Por medio del presente **CERTIFICO** que:

El Proyecto de Investigación correspondiente a los egresados **ÁLVAREZ CASTRO REINALDO RIGOBERTO** con C.I. 1600622995 y **LUNA FOX STING BRAYAN** C.I. 75698651 con el Tema: **“ELABORACIÓN DE UN PREPARADO HIDROSOLUBLE EN FORMA DE SÓLIDO PULVERULENTO A PARTIR DE ILEX GUAYUSA LOES”**, de la carrera, Ingeniería Agroindustrial. Directores del proyecto Dr. Radice Matteo y Dr. Crespo Arteaga Yasiel, ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 0%, Informe generado con fecha 13 de enero de 2020 por parte de los directores, conforme archivo adjunto.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes

Atentamente,

Ing. Atalo Marcelo Lara Pilco MSc.

ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA - .

Urkund Analysis Result

Analysed Document: TESIS-Alvares-y-Luna- Final-13-01-2020..pdf (D62309465)
Submitted: 1/13/2020 10:39:00 PM
Submitted By: mradice@uea.edu.ec
Significance: 0 %

Sources included in the report:

Instances where selected sources appear:

0

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El Tribunal de sustentación del Proyecto de Investigación y Desarrollo aprueba el proyecto de investigación y desarrollo “**Elaboración de un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de *Ilex guayusa* Loes**”

Dr. Manuel Lázaro Pérez Quintana
Presidente del Tribunal

Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez
Miembro del Tribunal

Msc. Julia Marianela Escobar Arcos
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por darme fuerza, sabiduría y sobre todo la Salud para cumplir una meta más en mi crecimiento profesional.

A la Universidad Estatal Amazónica, por brindarme un universo lleno de conocimientos y por permitirnos realizar el presente proyecto de investigación dentro de sus instalaciones.

A la Facultad de Ciencias de la Tierra, en honor a todos los docentes, quienes han sido nuestra guía durante mi formación académica.

Gracias a mi Madre Esther y a mi Abuelita María, por ser el pilar fundamental para cumplir una de mis metas, por confiar y creer en mis proyectos, por todos los consejos, valores y principios inculcados.

A toda mi familia, especialmente a mi Tío Luis y mi prima Verónica, quienes me apoyaron a través de sus consejos y su motivación diaria de una manera incondicional para culminar una meta más en mi vida.

A mis amigos, Sting, Carlos, Patricia, Katty, William, Johnny y futuros colegas que siempre me ayudaron de una manera desinteresada, gracias infinitas por brindarme todo el apoyo y su valiosa Amistad.

Al Dr. Luis Bravo, por brindarme su amistad, sus consejos y sobre todo los conocimientos durante la realización de nuestro proyecto de investigación de una manera desinteresada.

¡Muchas Gracias!

ÁLVAREZ CASTRO REINALDO R.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a DIOS por haberme dado salud y vida para cumplir una meta más en mi vida y por haberme dado sabiduría y fuerza para seguir adelante y no rendirme.

A la Universidad Estatal Amazónica, por compartirme un universo lleno de conocimientos y por permitirme realizar el presente proyecto de investigación dentro de sus instalaciones.

Con mucho amor a mi madre Ines Fox Pizarro y a mi padre Ubaldo Luna Zapata quienes han sido pilares muy importantes en todo este recorrido que he tenido en mi vida.

Con cariño a mis hermanos Luis, César, Franklin, Cristhofer y Camila por haberme apoyado moralmente, animándome y aconsejándome para terminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mi amigo Joe Menacho Malara, por brindarme su amistad y animarme a seguir adelante.

Al Dr. Matteo Radice por el apoyo en todo el proceso de investigación y por las enseñanzas compartidas.

Al Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez, por brindarme su amistad y por todo el conocimiento compartido de manera desinteresada.

“GRACIAS A TODOS”

LUNA FOX STING BRAYAN

DEDICATORIA

Este presente proyecto de investigación se lo dedico a Dios, por ser guía y luz en mi camino, por darme la fuerza y valentía para culminar este proceso muy importante en mi vida.

A mi Madre, por brindarme su apoyo incondicional, su paciencia y su sacrificio durante todos estos años que me ha permitido cumplir mi mayor anhelo.

Esther

A mi Abuelita, por su apoyo incondicional en este proceso de formación., Gracias por estar conmigo en todo momento, por sus consejos y por todos los valores y principios inculcados en mí.

María

ÁLVAREZ CASTRO REINALDO R.

DEDICATORIA

Este logro, en primer lugar, lo dedico a Dios por darme sabiduría e inteligencia y sobre todo por la fortaleza que me permitió llegar hasta el final.

A mis padres por brindarme su confianza, sus consejos e inculcarme valores para que sea una persona de bien.

A mis hermanos, que son personas muy importantes en mi vida, y fuente de inspiración para seguir enfrentando las adversidades de la vida.

A mis tutores, Dr. Matteo Radice y Dr. Yasiel Arteaga por ser mis guías, por dedicar su tiempo y por depositar su confianza en mí.

A mis maestros por haberme inculcado sus conocimientos durante todo este tiempo de mi formación.

LUNA FOX STING BRAYAN

RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo elaborar un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de extractos acuosos de *Ilex guayusa* Loes, considerando prioritario maximizar el contenido de cafeína y polifenoles. Las mejores condiciones para extraer la mayor cantidad de cafeína y polifenoles se identificaron con 15 g de guayusa en 100 mL de agua destilada, aplicando la decocción por 30 min. Mediante métodos espectrofotométricos se cuantificó la cantidad de cafeína y de polifenoles totales, las cuales arrojaron valores de 71,7 mg/L y 55,76 mg/L respectivamente. Se aplicaron las tecnologías de liofilización y *spray drying* para obtener dos muestras de sólido pulverulento hidrosoluble. Sobre ambas muestras se realizaron pruebas de solubilidad, dando como resultado una disolución en caliente (ebullición) en un tiempo menor a 30 segundos y en frío ($16^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) menor a 3 minutos. El pH para ambas muestras fue de 5,56 y 5,50 respectivamente. En el análisis de cenizas se obtuvieron resultados de 13,57% para la muestra liofilizada y 13,87% para *spray drying*. Las dos muestras de sólido pulverulento resultaron libres de microorganismos aerobios mesófilos, pero la muestra obtenida por liofilización evidenció presencia de *Salmonella*. Los sólidos pulverulentos mostraron un contenido de cobre y zinc respectivamente de 11,30 mg/kg y 69,60 mg/kg para la muestra obtenida por liofilización y de 12,35 mg/kg, 234,50 mg/kg para la muestra obtenida con el método *spray drying*. El hierro arrojó un resultado de 29,20 mg/kg y de 19,35 mg/kg para los dos extractos. El contenido de plomo resultó ser no detectable en ambas muestras. Los resultados obtenidos son coherentes con la normativa NTE INEN 1122:2013 relacionada a los requisitos de café soluble obtenido con las dos tecnologías mencionadas. Por lo tanto, la presente investigación sienta las bases para el desarrollo de un producto hidrosoluble a base de extracto de *I. guayusa* enriquecido en cafeína y polifenoles.

Palabras Claves: *Ilex guayusa*, polifenoles, cafeína, liofilización, *spray drying*.

ABSTRACT

The objective of this research project was to prepare a water-soluble solid powder from aqueous extracts of *Ilex guayusa* Loes, in order to maximize the content of caffeine and polyphenols. The best conditions for the extraction of the highest amount of caffeine and polyphenols were 15 grams of guayusa in 100 ml of distilled water, applying the decoction method for 30 minutes. The amount quantified the amount of caffeine and total polyphenols were determined by spectrophotometric methods and yielded values of 71,7 mg/L and 55,76 mg/L respectively for the most efficient extract. Freeze drying and *spray drying* technologies were applied to obtain two samples of water-soluble powdery solid. Solubility tests were performed on both samples, resulting in a hot (boiling) solution in less than 30 seconds and cold ($16\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) less than 3 minutes. The pH for both samples was 5.56 and 5.50 respectively. Considering the ash content, results of 13.57% were obtained for the lyophilized sample and 13.87% for *spray drying*. The two samples of powdery solid were free of mesophilic aerobic microorganisms, but the sample obtained by lyophilization method evidenced the presence of *Salmonella*. The powder solids showed a copper and zinc content respectively of 11.30 mg/kg and 69.60 mg/kg for the sample obtained by lyophilization and 12.35 mg/kg, 234.50 mg/kg for the sample obtained with the *spray drying* method. The iron content was 29.20 mg/kg and 19.35 mg/kg respectively. Lead content proved to be undetectable in both samples. The results obtained are consistent with the NTE INEN 1122: 2013 regulations related to the requirements of soluble coffee obtained with the two mentioned technologies. Therefore, the present investigation lays the foundations for the development of a water-soluble product based on extract of *I. guayusa* enriched in caffeine and polyphenols.

Keywords: *Ilex guayusa*, polyphenol, caffeine, freeze-drying, *spray drying*.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	5
2.1. GUAYUSA (<i>ILEX GUAYUSA</i>)	5
2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	5
2.3. USOS TRADICIONALES E HISTORIA DE LA GUAYUSA.....	6
2.4. PRODUCTOS EXISTENTES EN EL MERCADO A BASE DE GUAYUSA.....	7
2.5. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE LA <i>I. GUAYUSA</i>	7
2.6. CAFEÍNA	8
2.7.COMPUUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN GUAYUSA (<i>ILEX GUAYUSA</i>) ...	8
2.8. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA GUAYUSA	9
2.9. DECOCCIÓN, LIOFILIZACIÓN Y <i>SPRAY DRYING</i>	10
2.9.1. DECOCCIÓN	10
2.9.2. LIOFILIZACIÓN	10
2.9.3. <i>SPRAY DRYING</i>	10
2.9.4. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR.....	11
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	12
3.1. LOCALIZACIÓN.....	12
3.2. TIPOS DE INVESTIGACIÓN	12
3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN	12
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.4.1. MATERIAL VEGETAL.....	12
3.4.2.EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS, INSTRUMENTOS..	13
3.5. DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA:	13
3.6. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES:	14
3.7. DETERMINACIÓN DE PH.....	14
3.8. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES	15
3.9. DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD EN CALIENTE Y EN FRÍO.....	15
3.10. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES	15

3.11.	DETERMINACIÓN DE COBRE, PLOMO, HIERRO Y ZINC POR MEDIO DE ABSORCIÓN ATÓMICA	16
3.12.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
3.13.	PROCEDIMIENTO	17
3.13.1.	DECOCCIÓN	17
3.13.2.	TIPOS DE TECNOLOGÍAS.....	17
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1.	RENDIMIENTOS DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN Y SPRAY DRYING ...	20
4.2.	FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA.....	21
4.3.	FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN DE LOS POLIFENOLES TOTALES.....	29
4.4.	PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN BASE A LA NTE INEN 1122:2013	36
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	39
5.1.	CONCLUSIONES	39
5.2.	RECOMENDACIONES.....	40
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	41
7.	ANEXOS.....	45

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La Amazonía Ecuatoriana es considerada uno de los sectores con más biodiversidad en el mundo, su inmensa variedad de plantas motiva que se hagan constantes investigaciones tanto en el área alimentaria como también en el campo de desarrollo de materias primas orientadas al mercado cosmético y farmacéutico (Radice et al., 2016); (Radice & Vidari, 2007). *I. guayusa*, debido a sus propiedades antioxidantes, energizantes y estimulante ha despertado un gran interés a nivel mundial (Carrera, 2017).

La mayoría de las especies que se hallan en Ecuador, son desconocidas en el mundo moderno, sin embargo, las diferentes culturas indígenas, debido a las diferentes propiedades benéficas han utilizado distintas plantas para aprovechar sus propiedades curativas, tal es el caso de la *I. guayusa* (Rocha, 2018).

I. guayusa, es una planta autóctona de la región amazónica del Ecuador, con poca frecuencia se encuentra en las chacras como un cultivo laborado por los agricultores, no obstante, debido al gran interés que ha creado, paulatinamente se están aumentando cultivos de provecho comercial. Los pueblos oriundos de la región amazónica de Ecuador, principalmente de las provincias de Pastaza y Napo, utilizan las hojas de esta planta para preparar decocciones antes de llevar a cabo ceremonias donde son partícipes los moradores de cada pueblo (Rocha, 2018).

Acorde a los registros herbarios situados en Loja, *I. guayusa* se encuentra situada en diferentes provincias de Ecuador, de las cuales se pueden mencionar a Zamora Chinchipe, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Sucumbíos (Rocha, 2018).

I. guayusa se encuentra dentro de las variedades del género *Ilex* y representa una de las distintas especies que producen cafeína, usada desde tiempos recientes como estimulante y medicinal (Rocha, 2018).

El contenido de cafeína presente en *I. guayusa* puede fluctuar entre 2,90 a 3,28% en base seca, la bebida de guayusa es utilizada por indígenas de la Amazonía ecuatoriana como un medicamento natural, pero también como una bebida relajante, de hospitalidad y de bienvenida (Carrera, 2017).

Además de la cafeína, la especie es científicamente relevante por su contenido de polifenoles tales como el ácido clorogénico y quercetin-3-O-hexosa, moléculas conocidas por su actividad antioxidante (Villacis, Stinco, Jerves, Ortiz, & Ruales, 2017).

Con estos antecedentes la finalidad del presente estudio es elaborar un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de *I. guayusa*, considerando que por su contenido de cafeína y polifenoles se convierte en un ingrediente para bebidas energizantes o alimentos funcionales.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, en el mercado existen variedades de productos elaborados a partir de la especie *I. guayusa*, sin embargo, no se cuenta con productos de alto valor agregado, obtenidos con tecnologías agroindustriales innovadoras que garanticen una mayor estabilidad y aprovechamiento.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Ecuador pertenece al selecto grupo de los 17 países considerados mega diversos. Por lo tanto, la presencia de un enorme número de especies vegetales ha permitido que las poblaciones locales hayan experimentado empíricamente sus usos tanto como alimentos así como remedios para el tratamiento de varias enfermedades (Radice & Vidari, 2007).

I. guayusa es una planta ampliamente difundida en Ecuador, Colombia y Perú y desde la antigüedad hasta hoy se aprovechan las hojas con la finalidad de elaborar infusiones o decocciones. Se atribuye a la especie una serie de propiedades medicinales, de las que se pueden mencionar: regulador de la cantidad de glucosa presente en la sangre, estimulante muscular y nervioso, expectorante y digestivo (Medardo, 2007).

La importancia de los compuestos polifenólicos y de la cafeína como principios activos para alimentos funcionales, fármacos y cosméticos ha sido ampliamente abordada en la investigación básica. La justificación del presente estudio se basa en el requerimiento por parte de los sectores anteriormente mencionados, de nuevos ingredientes capaces de otorgar a un alimento, un cosmético o un fármaco propiedades beneficiosas para la salud humana

I. guayusa representa una oportunidad de desarrollo económico local para varios sectores de la Amazonía ecuatoriana, permitiendo además la aplicación de prácticas

agroindustriales innovadoras, sostenibles y sustentables, como se evidencia en los principios y criterios del Biocomercio (Torres *et al.*, 2017).

La aplicación de las tecnologías de liofilización y *spray drying* para la obtención de un extracto sólido pulverulento presenta un enfoque novedoso para la obtención de nuevos derivados de *I. guayusa*.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Elaborar un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de extractos de la especie *I. guayusa*.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener un preparado líquido optimizado mediante decocción, sobre la base del contenido de polifenoles y cafeína.
- Comparar las técnicas de liofilización y de *spray drying* para la obtención del sólido pulverulento, teniendo en cuenta los parámetros físico-químicos y microbiológicos.

CAPÍTULO II

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. GUAYUSA (*Ilex guayusa*)

I. guayusa, es una planta que pertenece a la región amazónica y crece en el Sur de Colombia, Ecuador y Norte del Perú. Sin embargo, esta planta es utilizada de manera ancestral por los diferentes pueblos y nacionalidades indígenas por sus propiedades medicinales (Villacis, Stinco, Jerves, Ortiz, & Ruales, 2017). Las hojas de la *I. guayusa* son sometidas a un proceso de secado y posterior a ello se elaboran infusiones conocida en la medicina tradicional por las siguientes propiedades terapéuticas: estimulante nervioso y muscular, expectorante, digestivo y reductor del nivel de glucosa en la sangre. Las investigaciones anteriormente mencionadas sobre la especie han identificado la presencia de varios metabolitos secundarios prevalentemente cafeína, polifenoles y aminoácidos (Wise & Negrin, 2019); (Radice et al., 2017).

Además, la *I. guayusa* contiene teobromina, un estimulante que generalmente se encuentra en el chocolate, y L-teanina, un ácido glutámico que se encuentra en el té verde que ha demostrado reducir la fatiga física y mental (Fundación Chankuap, 2013).

2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

I. guayusa se caracteriza por un tronco delgado y flexible y su altura puede oscilar entre los 10 y 25 metros. Su diámetro de la elevación al pecho fluctúa entre los 20 y 50 cm aproximadamente. El follaje que presenta esta planta es muy denso (Salvador & Salazar, 2014).

La flor presenta pétalos obtusos de color blanco verdoso, así como ovario sésil subgloboso con cavidades que pueden variar entre los 4 y 6, también posee un fruto que tiene forma de baya con una coloración verde de aproximadamente 10 mm de ancho (Humanante & Caranqui, 2011).

I. guayusa se desarrolla a temperaturas que fluctúan entre 26 a 28°C y soporta precipitaciones anuales de 1000 a 3000 mm (Salvador et al. 2017).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *I. guayusa*

Nombre Científico	<i>Ilex guayusa</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Celastrales
Familia	Aquifoliácea
Género	<i>Ilex</i>
Especie	<i>Guayuasa</i>
Autor	<i>Loes</i>

Fuente: (Medardo, 2007)

2.3. USOS TRADICIONALES E HISTORIA DE LA GUAYUSA

I. guayusa es considerada una planta autóctona de la Amazonía ecuatoriana y, debido al contenido de cafeína, es utilizada para la elaboración de bebidas con efectos estimulantes y curativos. Las infusiones de *I. guayusa* son mencionadas por varios autores debido a sus usos etnomedicinales y, diferentes grupos étnicos de la región amazónica la usan para el tratamiento de enfermedades venéreas, diarrea y artritis, como producto natural emético, estimulante, como tónico estomacal y remedio para el resfriado. Se ha registrado también el uso tradicional como analgésico, diurético, promotor de la fertilidad para las mujeres (Schultes, 1979); (Dueñas, Jarrett, Cummins, & Logan, 2016).

I. guayusa es caracterizada por ser una planta con uso medicinal, por ende, ha sido utilizada por grupos Jíbaros y Achuar desde la antigüedad. Hay evidencias de su uso en rituales en el año 355 a.C (Coronel, 2017). Las poblaciones nativas de la Amazonía ecuatoriana usan las hojas maduras para la elaboración de infusiones para ser ingeridas todas las mañanas como protección de animales silvestres (serpientes, insectos) y también como ritual de purificación (Coronel, 2017).

2.4. PRODUCTOS EXISTENTES EN EL MERCADO A BASE DE GUAYUSA.

Según investigaciones realizadas por ProEcuador (2016), a nivel nacional se encuentra el 95% de la producción mundial de guayusa, que se cultiva de manera orgánica.

En la provincia de Pastaza (Ecuador), existe un emprendimiento llamado “Guayusacha”, que elabora bebidas embotelladas e infusiones a partir de las hojas de guayusa (Massón, 2019).

A nivel nacional existen diferentes productos elaborados a partir de *I. guayusa* presentados en forma de bebidas, sin embargo, hay otros productos elaborados por el emprendimiento Sachaendemic y su marca “Wa”. Este Contiene tres diferentes productos que son: Bebida de Guayusa Wá-Flor de Jamaica, Bebida de Guayusa Wá-Jenjibre y Bebida de Guayusa Wá-limón (Garcia & Solorzano, 2016).

El uso de bebidas energizantes a nivel nacional y mundial ha ido en auge debido a la demanda globalizada del mundo moderno. Según la revista *The Grocer*, en Ecuador las bebidas energizantes y otros productos destinados para deportistas, en los venideros tres a cinco años podría aumentar en USD 733 millones. No obstante, según investigaciones de mercados llevados a cabo por Zenith International (2016), muestran una declinación de consumo del 1% anual desde el 2016 hasta el 2021 (Coronel, 2017).

2.5. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE LA *I. GUAYUSA*

Según Wise & Negrin (2019), la composición química de la guayusa presenta importantes metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y metilxantinas (cafeína, teobromina). Además, han sido detectados terpenoides, aminoácidos y carbohidratos que completan el conjunto de moléculas bioactivas presentes en la especie. Un estudio anterior realizado por Radice *et al.*, (2016) identifica, además de los metabolitos anteriormente mencionados, la presencia de guanidina y ácido ursólico.

2.6. CAFEÍNA

La cafeína es un alcaloide xantínico (1, 3, 7 trimetilxantina) que deriva de la purina mediante la condensación de un imidazol junto a una pirimidina, presenta efectos psicoactivos relacionado al mejoramiento de las capacidades cognitivas, se trata además de una molécula presente en varias bebidas populares de diferentes culturas. Este alcaloide es legal en todo el mundo y se encuentra en mayor cantidad en el café, mate y en la guayusa. En el año 1819, Friedrich Runge aisló la cafeína del café por primera vez y su estructura química fue descrita en 1875 por E. Fisher. La cafeína pertenece del grupo de las xantinas (Cobos, 2017).

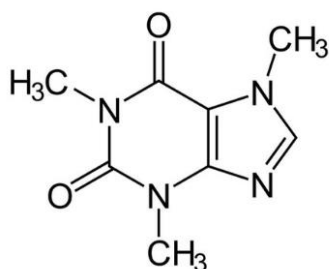
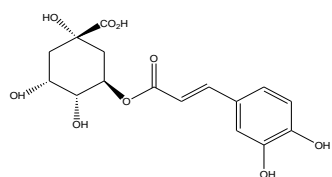


Figura 1. Estructura Molecular de cafeína

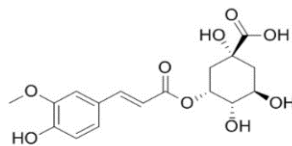
2.7. COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN GUAYUSA (*Ilex guayusa*)

La especie ha sido estudiada por el contenido de moléculas antioxidantes; un estudio realizado por Villacís-Chiriboga et al., (2017) ha permitido encontrar 14 compuestos fenólicos de los cuales 9 pertenecen a ácidos hidroxicinámicos cuyo primordial representante es el ácido clorogénico, los 5 compuestos fenólicos restantes corresponden a flavonoides de los cuales el más representativo es la quercetina-3-O-hexosa. Estos compuestos son de gran interés debido a sus efectos favorables en la salud.

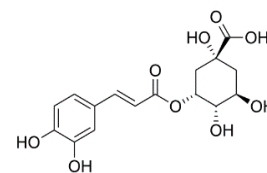
A continuación, se presenta la estructura de los compuestos polifenólicos.



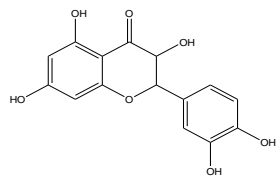
Ácido clorogénico



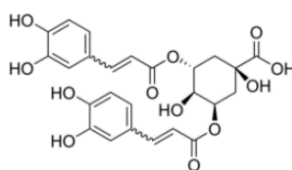
Ácido feruloilquinico



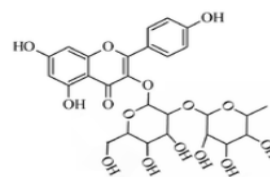
Ácido neoclorogénico



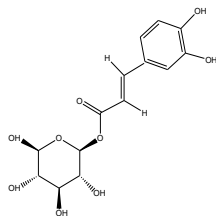
Quercetina-3-O-hexosa



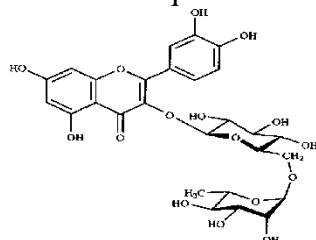
Ácido Dicafeoilquinico



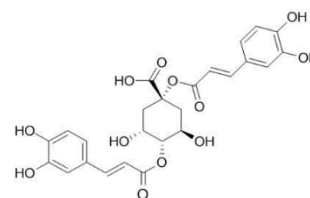
caempferol-3-O-hexosa



1-cafeína-beta-D-glucosa



quercetin-3-rutinósido (rutina)



Acido 3,4-Dicafeoilquinico

Figura 2. Estructuras moleculares de los polifenoles de *I guayusa*.

2.8. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA GUAYUSA

Según Wise & Negrin (2019), *I. guayusa* es una fuente de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, la cual se determina mediante la aplicación de un ensayo de blanqueo de β -caroteno y un ensayo de eliminación de radicales libres, donde indican la composición polifenólica y la capacidad antioxidante de la guayusa. Previamente en un estudio realizado por García-Ruiz et al. (2017), se identifica que la capacidad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de guayusa depende de la edad de la hoja y el tiempo de la cosecha. Los mismos autores mencionan, además, que la guayusa es utilizada como un antimicrobiano, antidiabético, antiinflamatorio y potencializador a la fertilidad de la mujer.

Según Radice et al (2016), la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos brindan una acción protectora contra los daños ocasionados por los radicales libres, asimismo, debido a la presencia de guanidina, la guayusa puede disminuir la hiperglucemia, sin alterar el parámetro de homeostasis de la glucosa, además indica que extractos hidroalcohólicos y metanólicos de guayusa poseen una acción antifúngica hacia la *Candida albicans* y *Microsporium canis*.

2.9. DECOCCIÓN, LIOFILIZACIÓN Y SPRAY DRYING.

2.9.1. DECOCCIÓN

Es un método de extracción discontinua donde se sumerge la droga (sólido de origen vegetal) en agua a temperatura de ebullición por un tiempo que puede variar entre los 15 y 30 minutos. Este método es aplicado a drogas vegetales que permiten obtener extractos y es extremadamente común en el mercado alimenticio por lo que se refiere a bebidas calientes obtenidas al momento del consumo (Farkas, Horváth, & Molnár, 2014)

2.9.2. LIOFILIZACIÓN

El proceso de liofilización de un alimento comprende básicamente la congelación y consecuente separación del agua por medio de sublimación, identificando las condiciones oportunas de presión y temperatura en las cuales no hay fase líquida. El ciclo de liofilización incluye la preparación adecuada del material, dependiendo de su estado físico, la congelación, la sublimación del hielo desarrollado que, colocado al vacío, se calienta progresivamente para separarlo de la muestra (secado primario), y finalmente la desorción (secado secundario) Cheng, Dong, Long, Zhao, & Hu, (2018); May & Rey, (2004).

2.9.3. SPRAY DRYING

La tecnología *spray drying* es considerada como una operación unitaria muy importante dentro de la aplicación de procesos en la industria alimentaria, química y farmacéutica. Esta consiste en la transformación de una disolución en un material seco particulado (Mondragón, Julia, Barba, & Jarque, 2013). Este método es apropiado para secar extractos acuosos de plantas que contienen compuestos que son sensibles al calor o termolábiles.

El proceso de *Spray Drying* es considerado un proceso continuo donde se transforma un extracto acuoso en partículas secas, se deben tener en consideración ciertos parámetros que están directamente relacionados con el rendimiento del producto final y uno de ellos es la concentración de sólidos totales, la cual no debe tener porcentaje de humedad mayor a un 90%, así mismo la temperatura de entrada del extracto al equipo debe ser de 140°C y la temperatura de salida de 80°C (Santos, y otros, 2017).

2.9.4. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR

El espectrofotómetro, es un instrumento que compara la radiación absorbida por una disolución que posee una cantidad determinada de soluto. Tiene como fundamento teórico la cuantificación de la absorbancia o transmisión de luz de una muestra en relación a una longitud de onda determinada. (Yurkanis, 2007).

En el presente estudio se ha utilizado un espectrofotómetro UV el cual presenta la emisión de ondas electromagnéticas en un rango entre 200 y 1100 nm. Tanto la cafeína como los compuestos polifenólicos son metabolitos con una actividad biológica relevante. La cuantificación de los mencionados compuestos es importante en cuanto indica el potencial promisorio del sólido pulverulento como fuente de cafeína y polifenoles, considerando que la primera molécula ejerce una acción estimulante y que la presencia de polifenoles es notable en cuanto permite prever una actividad antioxidante promisoriosa.

En los polifenoles, su actividad biológica guarda relación con su capacidad de mejorar la calidad de un alimento debido a que son los responsables de la conservación de algunas características organolépticas (García, Fernández, & Fuentes, 2016).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. LOCALIZACIÓN

El presente proyecto de investigación se realizó en la Universidad Estatal Amazónica (UEA) ubicada en el km 2 ½ vía al Tena, provincia Pastaza con una altitud de 940 m.s.n.m., latitud de 00 59' -1" y longitud de 77O 49' 0'' W. Además, se contó con el apoyo del Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular ubicado en la Universidad regional amazónica "Ikiam" para realizar el proceso de liofilización; y el laboratorio de investigación de la Facultad de Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el Campus Huachi en la avenida los Chasquis y Río Payamino ciudad de Ambato, Tungurahua, Ecuador; donde se llevó a cabo el proceso de *Spray Drying*.

3.2. TIPOS DE INVESTIGACIÓN

Se utilizaron como fuente de información artículos científicos, libros e investigaciones de instituciones públicas que están relacionadas al tema, esto permitió obtener información sobre los diferentes procesos y métodos que se utilizaron para la extracción de la cafeína y polifenoles de las hojas de *I. guayusa*.

3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

En la fase experimental se emplearon métodos cuantitativos que permitieron medir la cantidad de cafeína y polifenoles totales obtenidos en el producto. Además, fueron aplicadas las técnicas de liofilización y *spray drying* para la obtención de sólidos pulverulentos y las metodologías analíticas para la determinación de los parámetros de calidad de los productos finales. En relación a las fuentes secundarias se utilizaron artículos, libros, metodologías analíticas y normas INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización) con la finalidad de completar la realización del presente documento.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. MATERIAL VEGETAL

Las hojas de guayusa se adquirieron en la fundación Chankuap ubicada en el barrio simón Bolívar de la ciudad de Macas-Ecuador, estas hojas se encuentra secas y empacadas en sobres de 35 g.

3.4.2. EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS, INSTRUMENTOS

Tabla 2: Equipos, materiales y reactivos

EQUIPOS E INSTRUMENTOS	MATERIALES	MUESTRAS	REACTIVOS Y DISOLVENTES
-Balanza Analítica.	-Pipetas graduadas.	-Hojas secas de <i>Ilex guayusa</i> Loes.	Ácido clorhídrico -HCl 0,01M
-Planchas de calentamiento.	-Equipo de reflujo.		Hidróxido de sodio -NaOH 1 M
-Espectrofotómetro UV-Vis.	-Embudos separadores.		Cloroformo -CHCl ₃
-Espectrofotómetro de absorción atómica	-Celda de vidrio y cuarzo para lectura		-Reactivo de Folin Ciocalteu
-pHmetro	-Balones de vidrio		-Alcohol
-Mufla	-Papel Filtro		-Ácido Nítrico
-Campana de extracción	-Mecherero		-Peróxido de hidrógeno
-Sistema de digestión por microondas	-Vasos de precipitación		
	-Soporte Universal		
	-Pinzas de metal		
	-Matraz de Erlenmeyer		

3.5. DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA:

Se pesaron, de acuerdo con el diseño experimental 5 g, 10 g y 15 g de muestra de hoja seca de *I. guayusa* y se colocaron en un balón aforado de 500 ml, seguidamente se agregaron 100 ml de agua destilada dejando en reflujo respectivamente por 15 min, 22,5 min y 30 min, dependiendo del diseño experimental y de la muestra sometida a análisis. Luego se filtró en caliente y se dejó enfriar para después alcalinizar con NaOH 0,1 M (20 gotas), después se extrajo la cafeína con dos porciones de cloroformo de 15 ml cada una. Finalmente, se reunieron los extractos clorofórmicos y se evaporó hasta la sequedad en baño María; se disolvió la cafeína añadiendo 50 ml de agua destilada caliente (60°C-90°C), se enfrió, se colocó a un matraz aforado de 100 ml y se enrasó con agua destilada; de la disolución anterior, se tomaron 5 ml hacia un matraz aforado de 25 ml, se agregó 1 ml de HCl 0,01 M y se enrasó con agua destilada. Finalmente, la absorbancia de la muestra fue leída a una

longitud de onda de 275 nm, y se calculó la concentración de cafeína en la muestra por el método del patrón externo a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{C_m}{A_m} = \frac{C_p}{A_p}$$

C_m : Concentración de la muestra (que contiene la cafeína)

A_m : Absorbancia de la muestra

C_p : Concentración del patrón

A_p : Absorbancia del patrón

3.6. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES:

Se pesaron, de acuerdo con el diseño experimental 5 g, 10 g y 15 g de muestra de hoja seca de *I. guayusa* y se colocaron en un balón aforado de 500 ml, seguidamente se agregaron 100 ml de agua destilada dejando en reflujo respectivamente por 15 min, 22,5 min y 30 min. Luego se filtró en caliente y se tomó 1 ml del extracto en un matraz aforado de 10 ml y se agregó 0,5 ml del reactivo *Folin-Ciocalteu* diluido a la mitad con agua destilada y se dejó en reposo por 5 min, posteriormente se adicionó 0,5 ml de carbonato de sodio al 20% y se enrasó con agua destilada, se agitó, se cubrió de la luz por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la absorbancia se midió a 765 nm en el espectrofotómetro.

El contenido total de polifenoles se determinó utilizando una curva de calibración del ácido gálico y la concentración de polifenoles totales se expresó en gramos equivalentes de ácido gálico, para ello se empleó la siguiente ecuación:

$$A = 0,0734C - 0,0028$$

A: Absorbancia de la muestra

C: Concentración de la muestra

3.7. DETERMINACIÓN DE PH

Se determinó con la ayuda de un pH-metro, se pesó 1 gramo de las muestras pulverizadas de *I. guayusa* obtenidas por *Spray Dryng* y liofilización por separado, se disolvió en 15 ml de agua destilada y se anotó el valor de pH.

3.8. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

Se pesó 1 g de muestra obtenida por liofilización y *spray drying* por duplicado en un crisol, para luego colocarlas en una plancha de calentamiento a 500°C para carbonizarla, seguidamente se colocaron los crisoles en una mufla a una temperatura de 550°C por un tiempo de 5 horas, después de haberse cumplido el tiempo, con ayuda de pinzas metálicas se procedió a retirar las muestras y se dejó enfriar en un desecador por una 1 hora. El cálculo de las cenizas totales se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{M1 - m}{M2 - m} * 100$$

Donde:

C: Porcentaje de cenizas totales

M1: Masa del crisol más la muestra incinerada

M2: Masa del crisol más la muestra fresca

m: Masa del crisol vacío

3.9. DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD EN CALIENTE Y EN FRÍO

Se pesaron 2,5 g de muestra en un vaso de precipitación de 500 ml y se disolvieron en 250 ml de agua desmineralizada acabada de hervir. Se agitó moderadamente durante 30 segundos y se controló visualmente la presencia de sólidos no disueltos.

Se pesaron 2,5 g de muestra en un vaso de precipitación de 500 ml y se disolvieron en 250 ml de agua desmineralizada a 16°C±2°C. Se agitó moderadamente durante 30 segundos y se controló visualmente la presencia de sólidos no disueltos.

3.10. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES

Para la determinación de mesófilos totales y coliformes se utilizó el método de las diluciones sucesivas y la siembra por extensión, utilizando como medios de cultivo respectivamente el Plate Count Agar (PCA) y el Chromocult.

Los análisis se realizaron a partir de una disolución madre preparada mezclando 1 g de sólido pulverulento de *I. guayusa* (liofilización y *spray drying*) con 9 ml de agua destilada estéril. A partir de esta disolución se realizaron las diluciones sucesivas hasta la dilución 10^{-4} . De las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} se tomaron 100 μ l por repetición y se sembraron en cajas Petri, previamente preparadas. Por cada dilución se consideraron tres repeticiones. Para la determinación de coliformes totales se sembró directamente de la disolución madre ya que el objetivo no era cuantificar, sino determinar la presencia/ausencia de dichas bacterias. Las cajas se incubaron a una temperatura de 37°C por un tiempo de 48 h, para los microorganismos mesófilos y a 25°C por 48 h, para los coliformes. Transcurridas las 48 h se observaron las cajas para determinar si había crecimiento y se consideraron, para fines de conteo, exclusivamente las cajas Petri con número de colonias entre 30 y 300 UFC/ml. Para las bacterias coliformes se utilizó la tabla colorimétrica para interpretar los resultados, adjunta al medio de cultivo Chromocult. De hecho, en este medio de cultivo, las distintas especies de coliformes aparecen de diferentes colores, lo cual es un carácter taxonómico que permite reconocer de qué bacteria se trata.

3.11. DETERMINACIÓN DE COBRE, PLOMO, HIERRO Y ZINC POR MEDIO DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Para la digestión de la muestra se pesó 0,5 g de las muestras obtenidas por liofilización y *Spray Drying*, luego se adicionó 1 ml de peróxido de hidrógeno y 7 ml de ácido nítrico (HNO_3), seguidamente se colocaron los pocillos con las muestras en el equipo de sistema de digestión de muestras por microondas por un tiempo determinado de 1 h :30 min. Luego se colocó las muestras en matraces de 50 ml y este es aforado con HNO_3 . Finalmente, se procedió a la respectiva lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica para determinar la cantidad de Cu, Zn, Fe y Pb. Para la determinación de los metales mencionados se realizaron las respectivas curvas de calibración. Se aplicó la siguiente fórmula para determinar el nivel máximo de metales:

$$\frac{mg}{kg} = \frac{PPM \times FDI}{PM}$$

Donde:

PPM= Concentración de la muestra en partes por mg/L (Lectura de Absorción)

FDI= Factor de dilución en 1

PM= Peso de la muestra inicial.

3.12. DISEÑO EXPERIMENTAL.

La primera fase del trabajo enmarcó el diseño experimental de las muestras de decocción realizadas donde se evaluó el contenido en cafeína y polifenoles totales mediante el método espectrofotométrico, finalmente se estableció el mejor tratamiento en función de la concentración de cafeína y polifenoles totales. Se aplicó el diseño experimental mediante el software Design Expet. A continuación, se plantea el siguiente Diseño factorial 2²:

Factor A: Relación sólido-líquido

A0: 5 g de droga vegetal en 100 mL de agua

A1: 10 g de droga vegetal en 100 mL de agua

A2: 15 g de droga vegetal en 100 mL de agua

Factor B: Tiempo

B0: 15 min

B1: 22,5 min

B2: 30 min

Tabla 3: Diseño experimental

Simbología	Cantidad vs Volumen	Tiempo
A0, B0	5g – 100ml	15 min
A0, B1	5g – 100ml	30 min
A1, B0	10g – 100ml	15 min
A1, B1	10g – 100ml	22.5 min
A2, B0	15g – 100ml	15 min
A2, B1	15g – 100ml	30 min

3.13. PROCEDIMIENTO

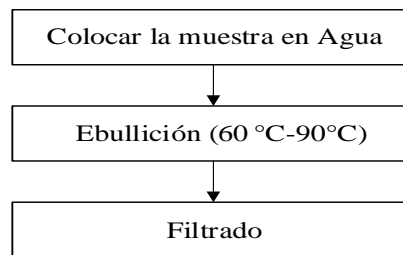
3.13.1. DECOCCIÓN

Se realizó la decocción a partir de las hojas de guayusa adquiridas en un emprendimiento local llamado Fundación Chankuap ubicado en la provincia de Macas, Morona Santiago, donde se controló los siguientes parámetros: Tiempo de decocción y Temperatura.

3.13.2. TIPOS DE TECNOLOGÍAS

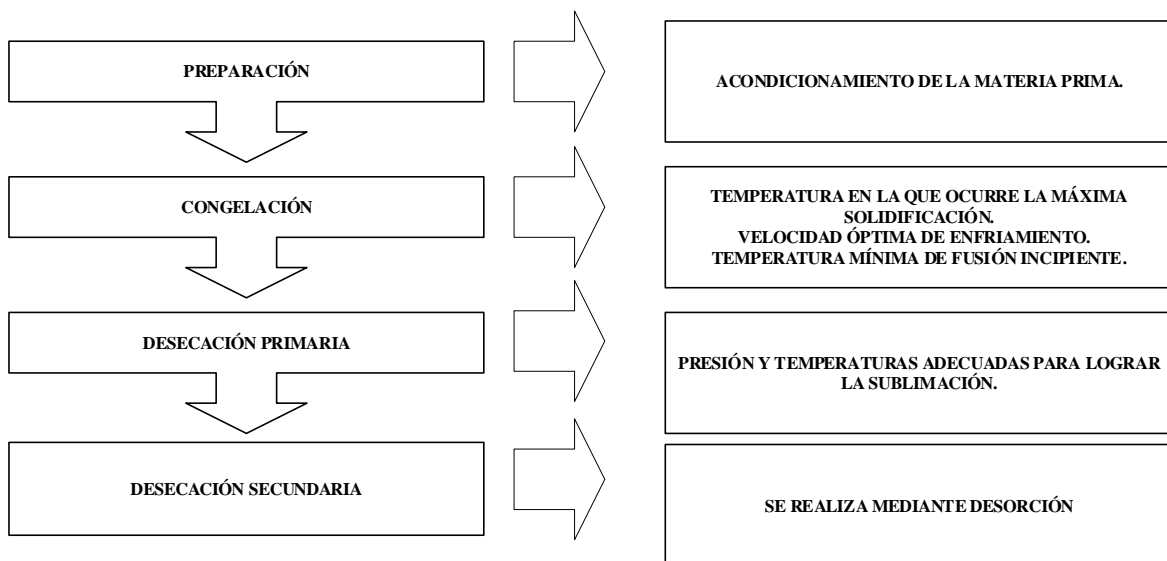
Para la elaboración del preparado hidrosoluble se aplicaron dos tipos de tecnologías, respectivamente: la liofilización y el método denominado *Spray Drying*.

Diagrama 1: Proceso de Decocción.



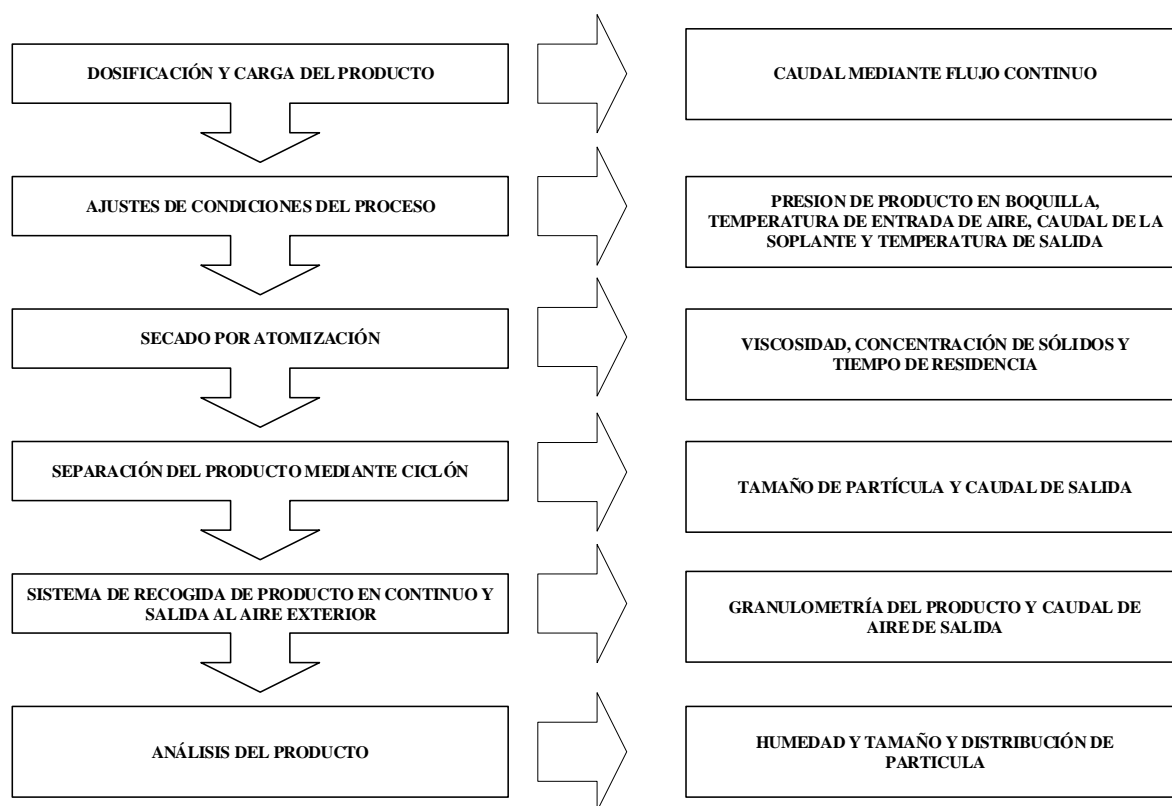
Fuente: (Farkas *et al.*, 2014)

Diagrama 2: Principales etapas en los procesos de Liofilización.



Fuente: (Ponce, 2014)

Diagrama 3: Principales etapas en los procesos de secado por *Spray Drying*. (Atomización.).



Fuente: (Parrilla, 1957)

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RENDIMIENTOS DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN Y SPRAY DRYING

La obtención de los extractos pulverulentos con las dos tecnologías previstas dio respectivamente un rendimiento de 9,74% en el caso de la liofilización y 7,99% en el caso de la técnica *spray drying*. Esto puede deberse a que en la técnica de *spray drying*, la concentración inicial del extracto influye en el tamaño de la partícula sólida que se forma y, por tanto, aquellas de pequeño tamaño tienen probabilidad de escaparse en la corriente de aire, lo cual afecta el rendimiento. Esto puede mejorarse en la medida en la que se sometan a secado extractos previamente concentrados. Por otra parte, la liofilización parte de una congelación (-84,5°C), lo cual condiciona que el rendimiento sea superior.

4.2. FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA.

La presente investigación ha enfocado los efectos de dos factores, tiempo y relación sólido-líquido, en la extracción por medio de decocción de cafeína de la hoja de *I. guayusa*. Los valores de cada factor se muestran en la tabla 4. Los contenidos de cafeína obtenidos estuvieron entre 62,98 y 71,70 mg/L, calculado en relación a la masa seca, de acuerdo a las condiciones experimentales.

Tabla 4: Valores de concentración de la cafeína en los diferentes tratamientos

Exp	A	D	Cafeína
	Tiempo (min)	S/L (g/mL)	mg/L
1	15	5/100	65.96
2	15	5/100	64.47
3	15	5/100	65.30
4	15	15/100	67.87
5	15	15/100	68.30
6	15	15/100	66.81
7	22.5	10/100	68.94
8	22.5	10/100	66.81
9	22.5	10/100	67.66
10	30	5/100	62.98
11	30	5/100	64.68
12	30	5/100	64.04
13	30	15/100	71.49
14	30	15/100	71.70
15	30	15/100	68.72

La tabla 4 permitió apreciar la estimación de los efectos estandarizados positivos y sobre la extracción de la cafeína, teniendo en cuenta que Whitecomb & Oehlert (2007), mencionan que las variables altamente significativas corresponden a valores más altos de efectos estandarizados. Los efectos no significativos siguieron una distribución normal con media igual a cero y varianza constante.

El método implica que los efectos activos se evidencian en una posición alejada de la línea de normalidad mientras que los efectos no significativos tenderán a formar una línea recta.

Por lo tanto, los experimentos evidencian que el factor significativo ($p < 0,05$) fue la relación sólido-líquido, mientras que el tiempo de decocción resultó no significativo ($p > 0,05$). La relación entre los dos factores resultó ser significativa.

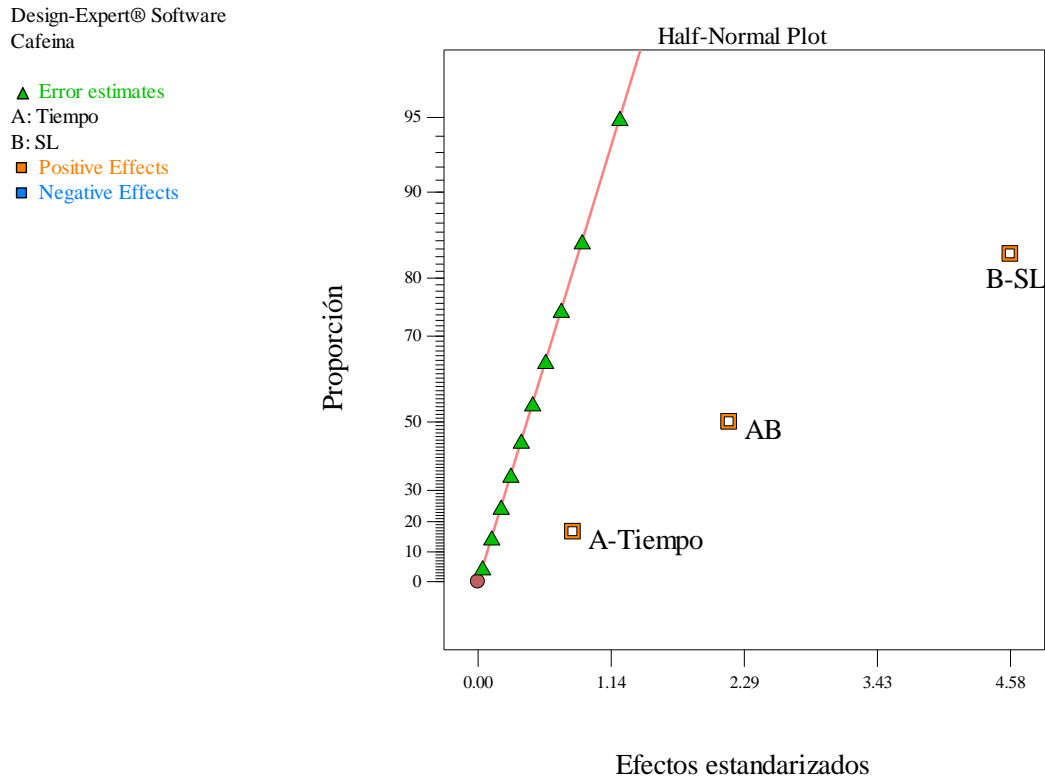


Figura 3. Efectos de los factores significativos y no significativos sobre extracción de cafeína en hojas de *I. guayusa*

Considerando el modelo propuesto por Anderson & Whitecomb (2016), cuando la diferencia de los valores entre R-predicho y R-ajustado es menor de 0,2 los mismos se consideran adecuados. En el caso del presente experimento el modelo factorial obtenido presenta un buen ajuste con un valor de R^2 0,8516. Se identifica como R-predicho 0,7253 y como R-ajustado 0.8112, cumpliendo con el requerimiento de una diferencia menor de 0,2.

Design-Expert® Software
Cafeína
(adjusted for curvature)

Color points by value of
Cafeína:

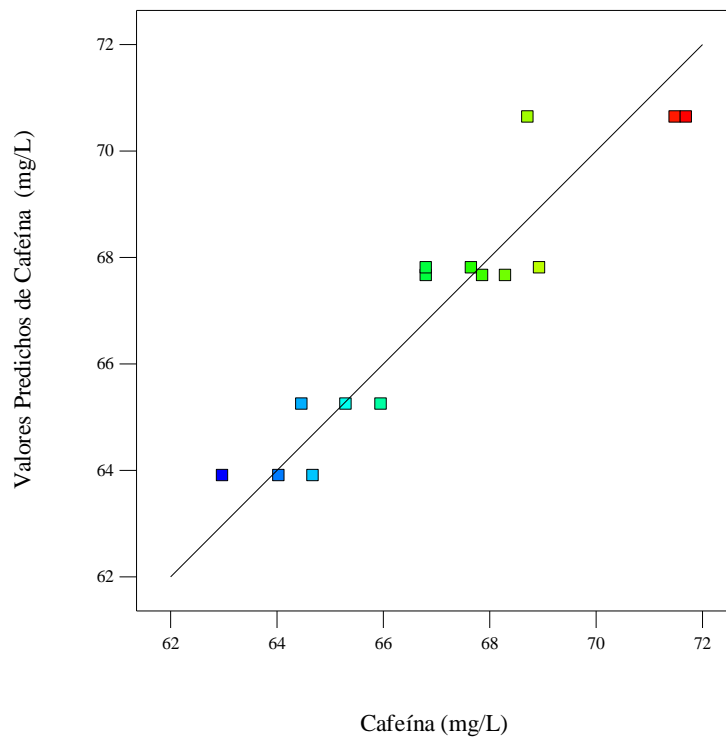


Figura 4. Relación entre los valores experimentales y predichos de la extracción de cafeína de hojas de *I. guayusa*.

En la tabla 5 se puede apreciar el modelo factorial seleccionado.

Tabla 5. ANOVA para el modelo factorial seleccionado

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	Valor F	p-valor (Prob > F)	
Model	78,84	3	26,28	21,05	< 0,0001	significativo
A-Tiem	2,00	1	2,00	1,60	0,2317	
B-SL	62,84	1	62,84	50,33	< 0,0001	
AB	14,00	1	14,00	11,21	0,0065	
Residual	13,73	11	1,25			
Falta de ajuste	2,14	1	2,14	1,84	0,2046	No significativo
Error Puro	11,60	10	1,16			
Total	92,57	14				
Corregido						

Paralelamente se ha desarrollado un gráfico de Pareto que incluye el límite de Bonferroni (Anderson & Whitecomb, 2016), como se muestra en la figura 5, evidenciando que en el caso de la extracción de cafeína el efecto de la relación sólido-

líquido se encuentra por encima del límite de Bonferroni, lo que indicó que se trata de un factor significativo mientras que el tiempo no tuvo influencia en la extracción, encontrándose por lo tanto debajo del límite de Bonferroni. La relación entre los dos factores más bien se presentó como significativa indicando que el tiempo por sí solo no afecta los rendimientos de extracción, pero potencia el efecto de la relación sólido-líquido.

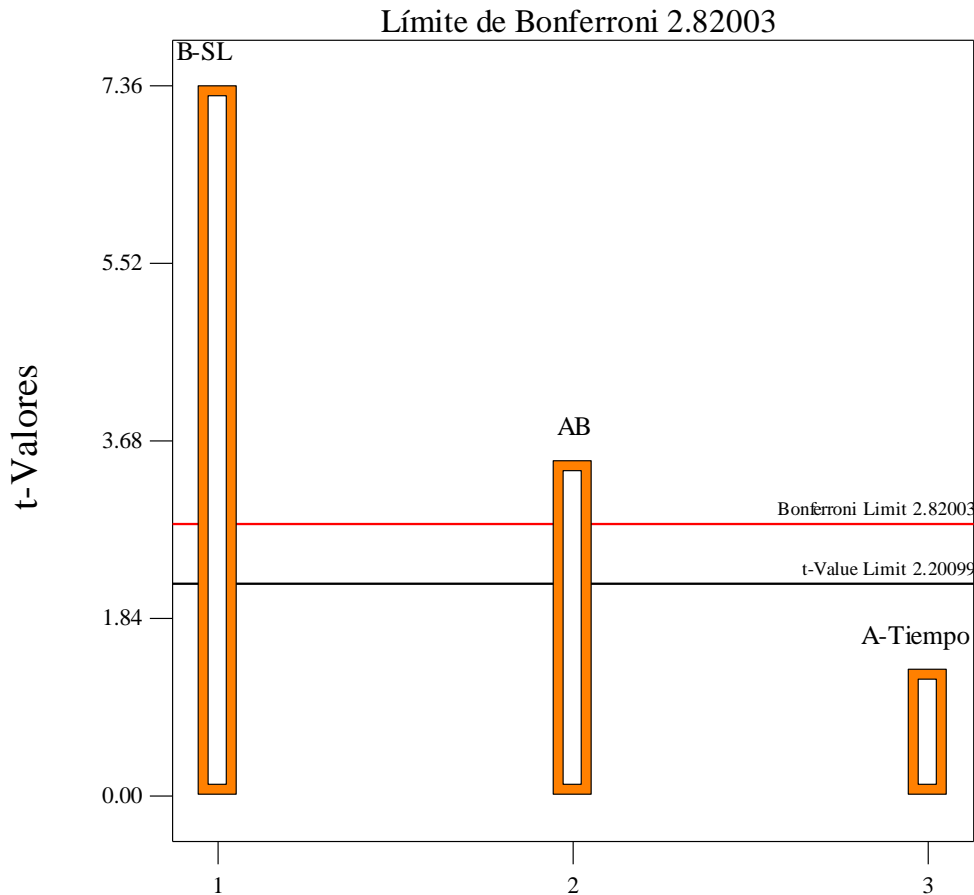


Figura 5. Diagrama de Pareto para el valor t de los efectos para la extracción de cafeína.

La ecuación, en términos de factores experimentales, se puede usar para hacer predicciones sobre la respuesta para los niveles de cada factor. La ecuación es útil para identificar el impacto relativo de los factores significativos al comparar los coeficientes de los factores:

$$\text{Cafeína} = 67,73 - 0,2\text{Tiempo} + 0,19\text{Relación sólido-líquido} + 0,03\text{Tiempo/Relación sólido-líquido}$$

El modelo predictivo se usó para generar gráficos de superficie, para el análisis de los efectos variable sobre el rendimiento de la extracción de cafeína. La interacción de los

factores estudiados en las variables dependientes se puede apreciar en la Figura 6 y 7. Se puede observar que al aumentar la relación sólido-líquido aumenta el rendimiento de extracción de cafeína mientras que al aumentar del tiempo no se evidencia un incremento significativo de la extracción de la cafeína.

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Cafeína

● Design Points

X1 = B: SL

Actual Factor

A: Tiempo = 22.5

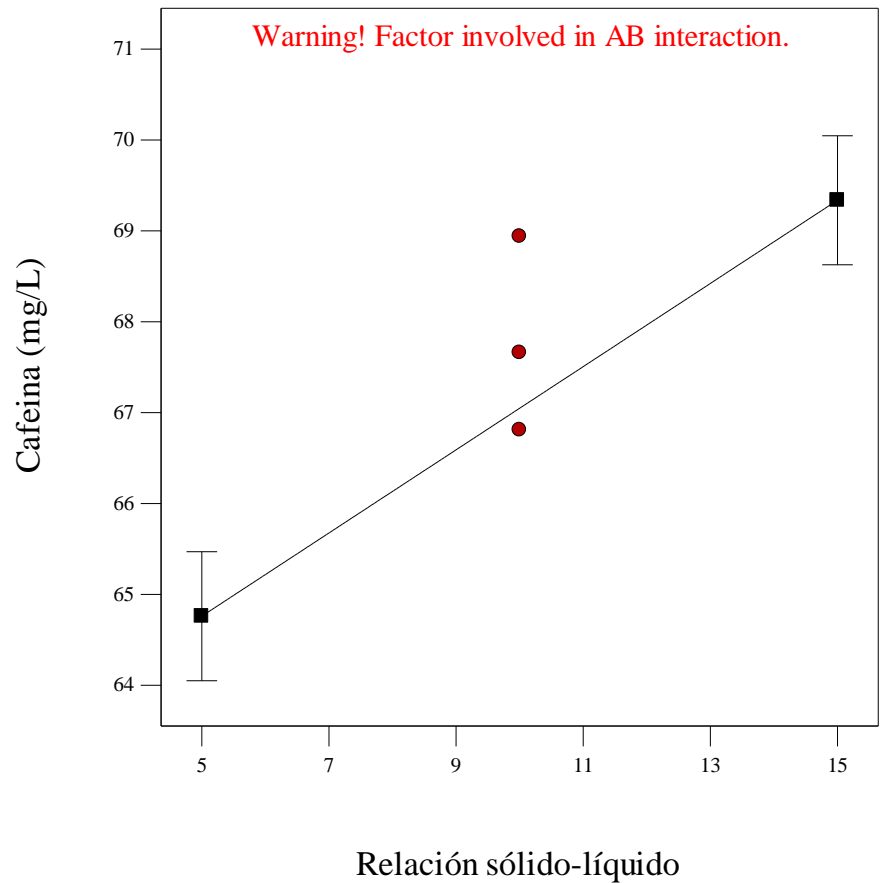


Figura 6. Interacción de los factores relación sólido-líquido y concentración de cafeína

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Cafeína
● Design Points
X1 = A: Tiempo
Actual Factor
B: SL = 10

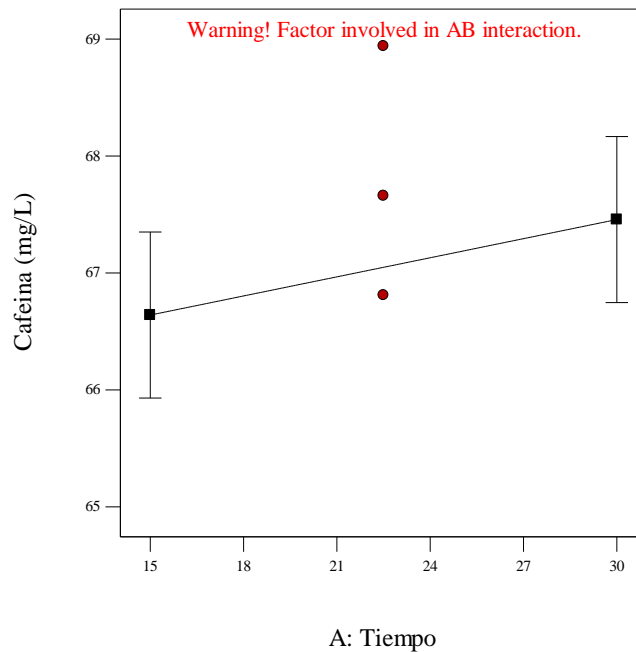


Figura 7. Interacción de los factores tiempo y concentración de cafeína

Analizando las figuras 6 y 7 se puede identificar que el extracto con el mayor contenido de cafeína, es decir el extracto que presenta las condiciones de extracción óptimas, corresponde al tratamiento con relación sólido-líquido de 15 g en 100 ml de agua. Siendo el tiempo un factor no significativo se eligió como extracto óptimo el que se da en un tiempo de 30 minutos porque en estas condiciones se obtienen la máxima cantidad de cafeína y polifenoles totales, la información relacionada a los polifenoles totales será detallada en el siguiente capítulo. Por lo tanto, se eligió este tratamiento para los siguientes procesos de liofilización y aplicación de la técnica *spray drying*.

La cafeína, según reporta Schuster & Mitchell, (2018), después de haberla ingerido en una dosis medida de (50-250 mg) se absorbe casi totalmente en 45 min. Las concentraciones límite de cafeína en la sangre se alcanzan luego de 30 minutos. En relación a los efectos procognitivos, las dosis más beneficiosas respecto al tiempo de reacción, efectos de memoria aguda y crónica, y vigilancia son de 100 a 300 mg. Los metabolitos secundarios presentes en la guayusa, pueden contribuir de dos formas en los efectos positivos de bebidas y alimentos que poseen metilxantina; primero debido a su sinergismo con la cafeína y teobromina son los responsables de producir efectos beneficiosos, y segundo podrían mitigar los efectos adversos que tienen la cafeína. Aunque la información relacionada a

investigaciones en humanos es escasa, estudios preliminares en ratas identifican que la asunción de cafeína parece aliviar el declino cognitivo debido a la edad.

En el presente estudio, considerando los varios tratamientos se obtuvo un valor de concentración de cafeína de 71,70 mg/L, que corresponde a 1,43 mg/g. Una investigación realizada por Wise, Graham; Santander, Demetrio, (2018) identificó un contenido de cafeína de 19,08 mg/g. El mismo estudio identifica que investigaciones realizadas por varios autores presentan un amplio abanico de valores de concentración de cafeína (8,13 – 75,8 mg/g), lo que implica que la variabilidad del contenido de cafeína en la guayusa merece ser profundizado en otras investigaciones. De hecho, la edad de la planta, su ubicación geográfica, las condiciones climáticas y de suelo y, la forma de recolección de la hoja (obtenida por una primera poda o por recolecciones sucesivas) son factores que pueden afectar la cantidad de cafeína.

Las figuras 8 y 9 representan respectivamente un gráfico tridimensional y un gráfico bidimensional que relacionan los factores de la investigación y el contenido de cafeína evidenciando una vez más la relevancia de la relación sólido-líquido y la falta de impacto del tiempo sobre el rendimiento de extracción.

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Cafeína

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

71.7

62.98

X1 = A: Tiempo

X2 = B: SL

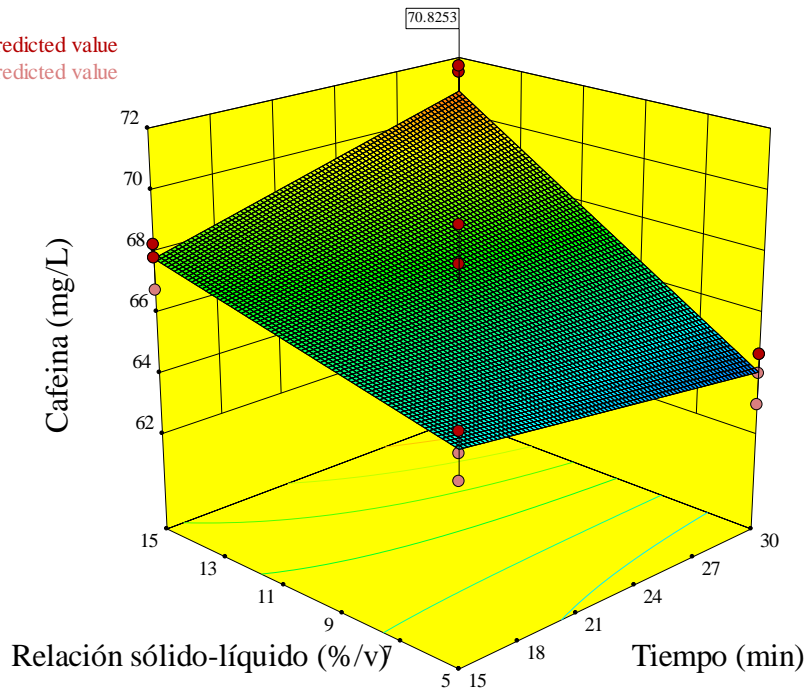


Figura 8. Interacción de los factores sólido-líquido y concentración de cafeína (gráfico tridimensional)

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Cafeína

● Design Points

71.7

62.98

X1 = A: Tiempo

X2 = B: SL

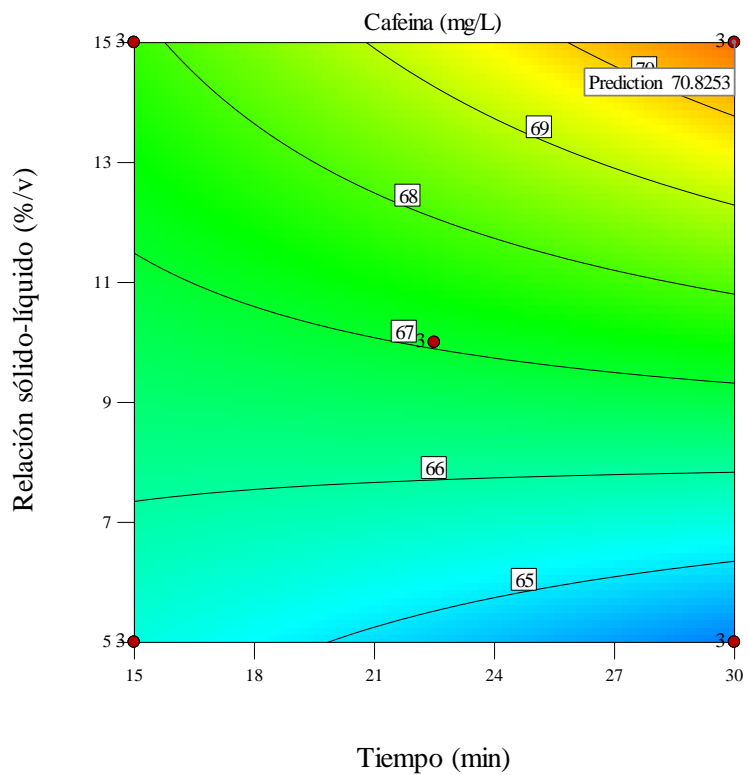


Figura 9. Interacción de los factores tiempo y sólido-líquido (gráfico bidimensional)

4.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN DE LOS POLIFENOLES TOTALES.

La determinación de los compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu presentes en extractos acuosos de la *I. guayusa* Loes, se usó la siguiente ecuación: $A = 0,0734C - 0,0028$; donde, A representa a la absorbancia de la muestra medida a 765nm en un espectrofotómetro y C concentración de la muestra, la constante 0,0734 representa la pendiente y 0,0028 el intercepto. La concentración de polifenoles totales se expresó en mg/L, sobre la base del ácido gálico y se obtuvo un intervalo de valores entre 33.0 mg/L y 55.76 mg/L. A continuación, se presenta la tabla 6 con los valores de los tratamientos realizados por triplicado para la determinación de polifenoles totales.

Tabla 6: Tratamientos realizados por triplicado para la determinación de polifenoles totales.

Exp	A	D	PT
	Tiempo (min)	S/L (g/mL)	mg/L
1	15	5/100	33.0
2	15	5/100	33.3
3	15	5/100	34.4
4	15	15/100	40.5
5	15	15/100	41.5
6	15	15/100	39.3
7	22.5	10/100	39.1
8	22.5	10/100	39.6
9	22.5	10/100	39.9
10	30	5/100	28.17
11	30	5/100	31.24
12	30	5/100	30.92
13	30	15/100	50.86
14	30	15/100	55.76
15	30	15/100	52.49

Como en el caso de la cafeína, apoyándose en el modelo propuesto para Whitecomb & Oehlert, (2007), las variables altamente significativas corresponden a valores más altos de efectos estandarizados y los efectos activos se evidencian en una posición alejada de la línea de normalidad mientras que los efectos no significativos tenderán a formar una línea recta. Por lo tanto, en el caso de los polifenoles totales los experimentos muestran que todos los factores, relación sólido-líquido, tiempo y la relación entre los dos son significativos ($p < 0,05$).

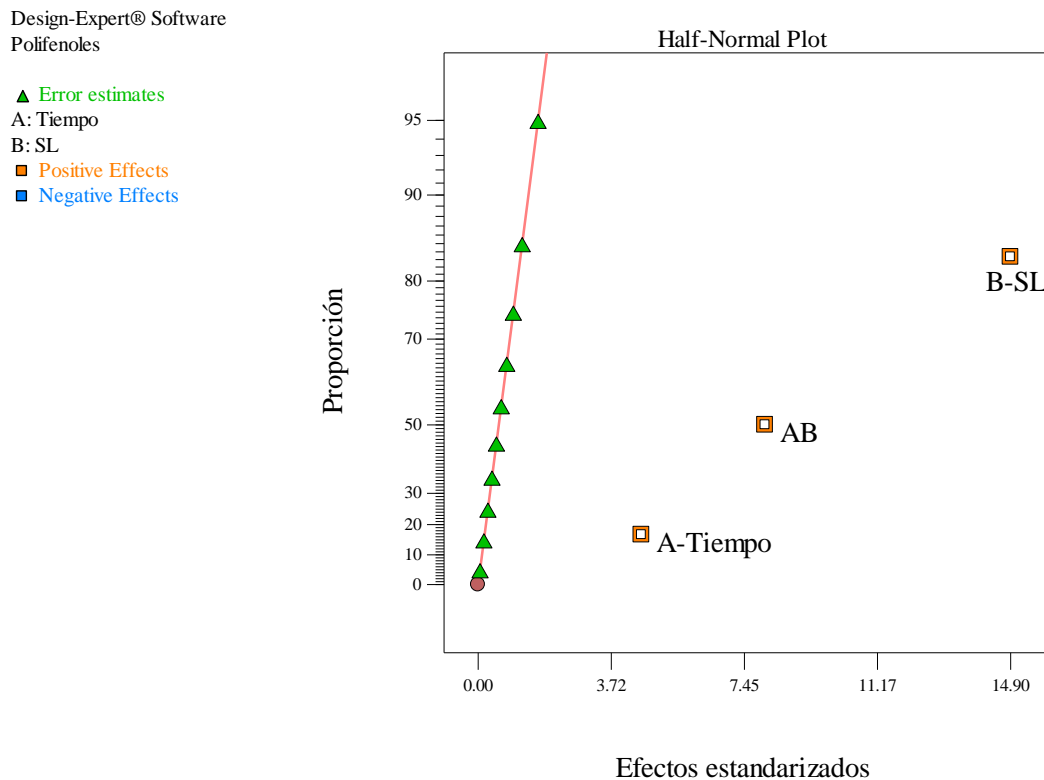


Figura 10. Efectos de los factores significativos y no significativos sobre extracción de polifenoles totales en hojas de *I. guayusa*

Igualmente, como en el caso de la cafeína, se considera que el modelo propuesto por Anderson & Whitecomb, (2016), identifica que la diferencia entre los valores de R-predicho y R-ajustado es menor de 0,2, y por lo tanto el modelo es adecuado. El presente estudio finalizado a la extracción de los PT presenta un buen ajuste con un valor de R^2 0,9766. Se identifica como R-predicho 0,9503 y como R-ajustado 0.9702, cumpliendo con el requerimiento de una diferencia menor de 0,2.

Design-Expert® Software
Polifenoles
(adjusted for curvature)

Color points by value of
Polifenoles:

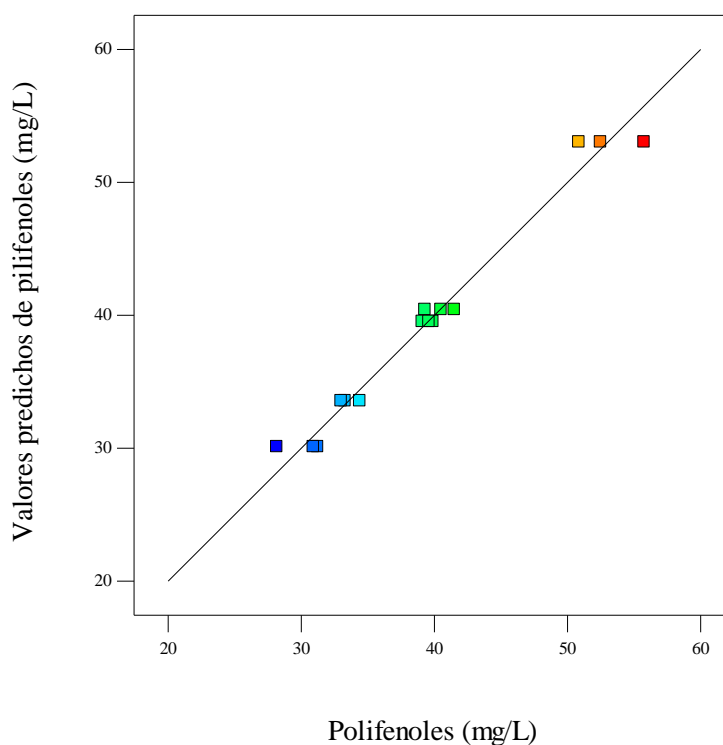


Figura 11. Relación entre los valores experimentales y predichos de la extracción de polifenoles totales de hojas de *I. guayusa*.

En la tabla 7 se puede apreciar el modelo factorial seleccionado.

Tabla 7. ANOVA para el modelo factorial seleccionado

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	Valor F	p-valor (Prob > F)	
Model	921,92	3	307,31	152,71	< 0,0001	significativo
A-Tiem	62,75	1	62,75	31,18	0,0002	
B-SL	665,73	1	665,73	330,82	< 0,0001	
AB	193,44	1	193,44	96,13	0,0001	
Residual	22,14	11	2,01			
Falta de ajuste	0,15	1	0,15	0,066	0,8019	No significativo
Error Puro	21,99	10	2,20			
Total	944,06	14				
Corregido						

Adicionalmente, se puede apreciar a continuación un gráfico de Pareto que incluye el límite de Bonferroni (Anderson & Whitecomb, 2016). La figura 12 evidencia que por lo que se refiere a la extracción de polifenoles totales el efecto de la relación sólido-

líquido, el tiempo y la relación entre los dos factores se encuentran por encima del límite de Bonferroni, indicando que todos los factores son significativos, aunque en manera diferente en cuanto el impacto más relevante es el de la relación sólido-líquido.

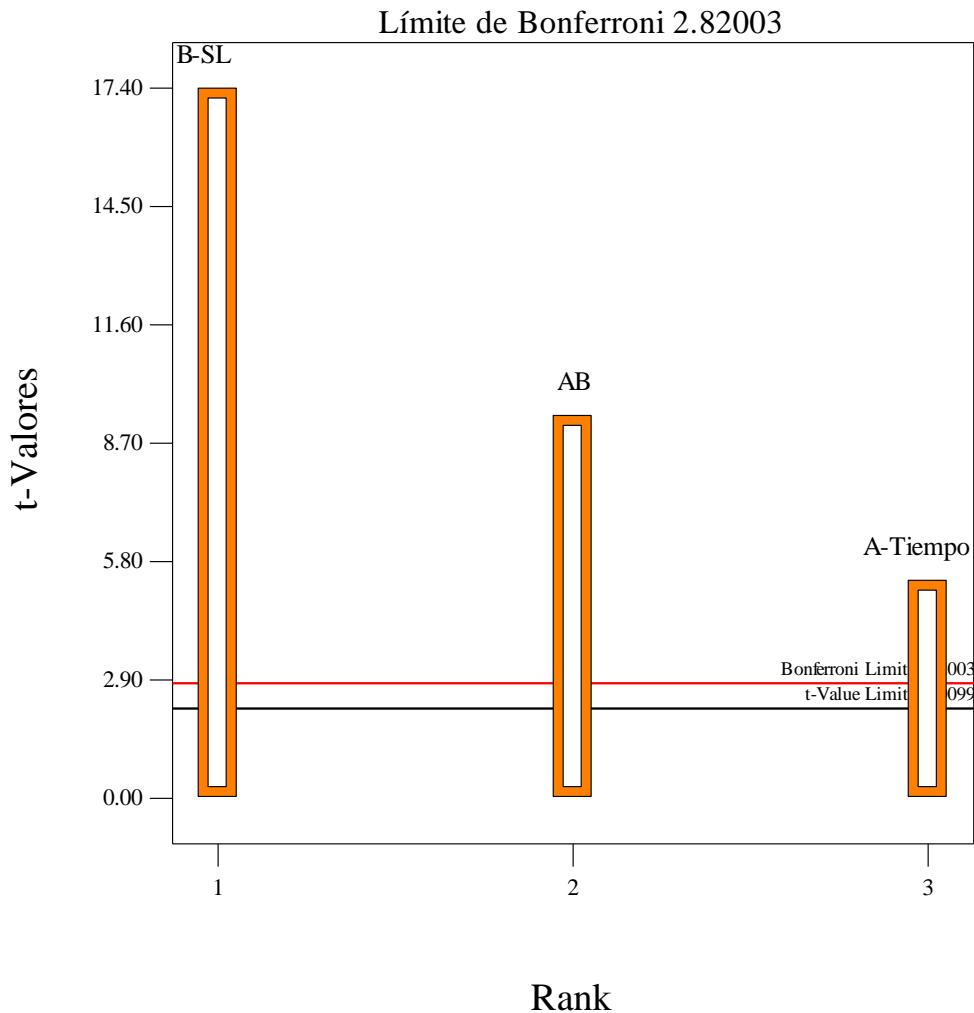


Figura 12. Diagrama de Pareto para el valor t de los efectos para la extracción de los polifenoles totales.

La ecuación es útil para identificar el impacto relacionado a la extracción de polifenoles se manifiesta a continuación:

$$\text{Polifenoles Totales} = 39.34 + 2,29\text{Tiempo} + 7,45\text{Relación sólido-líquido} + 4,02\text{Tiempo/Relación sólido-líquido}$$

Nuevamente, el modelo predictivo permitió generar gráficos de superficie, para el análisis de los efectos variable sobre el rendimiento de la extracción de los polifenoles (Figura 15 y 16).

Se puede observar que al aumentar de la relación sólido-líquido y el tiempo, aumenta el rendimiento de extracción de los polifenoles.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Polifenoles
● Design Points
X1 = B: SL
Actual Factor
A: Tiempo = 22.5

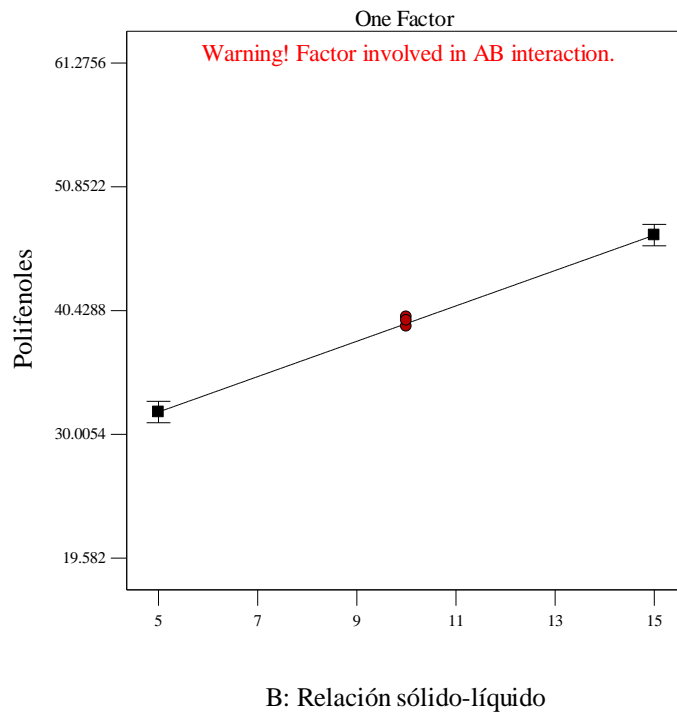


Figura 13. Interacción de los factores relación sólido-líquido y concentración de polifenoles.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Polifenoles
● Design Points
X1 = A: Tiempo
Actual Factor
B: SL = 10

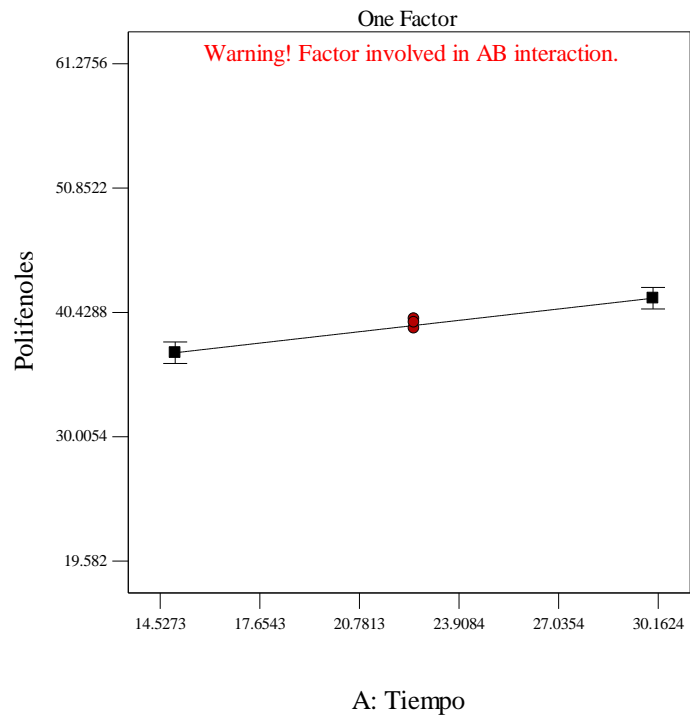


Figura 14. Interacción de los factores relación tiempo y concentración de polifenoles.

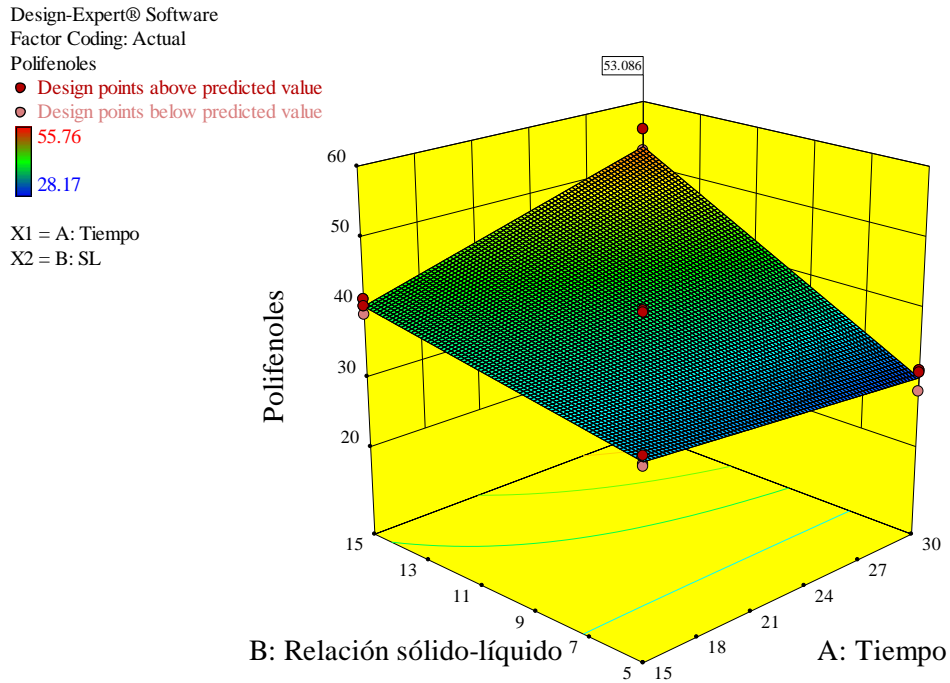


Figura15. Interacción de los factores sólido-líquido y concentración de los polifenoles totales. (gráfico tridimensional)

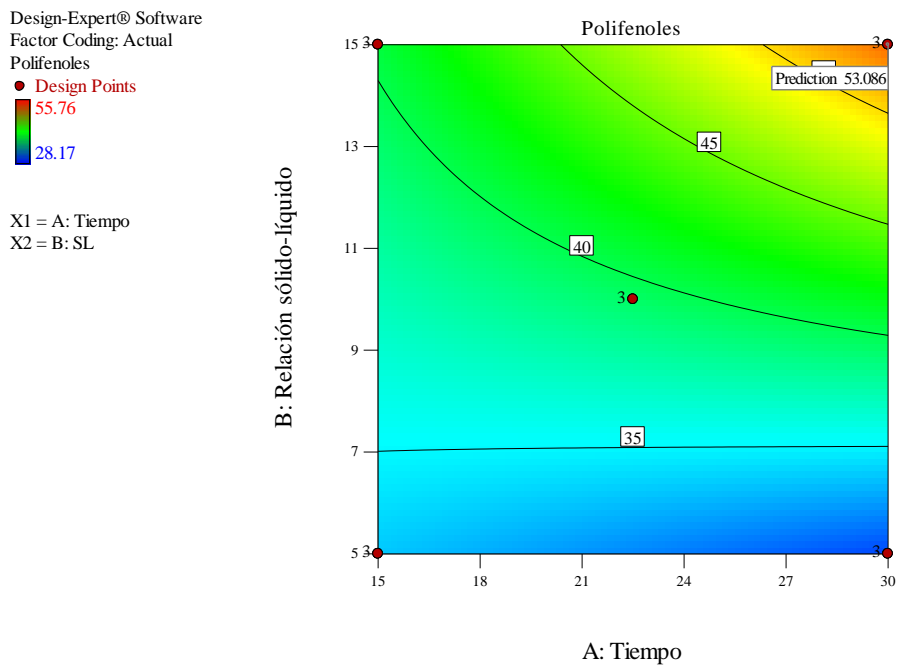


Figura 16. Interacción de los factores sólido-líquido y concentración de polifenoles totales. (gráfico bidimensional)

Un estudio realizado por Chianesea, (2019), indica que el aislamiento de gran cantidad de triterpenoides pentacíclicos que se encuentran presentes en la guayusa brindan mecanismos de acción y una gran cantidad de principios activos. García-Ruiz et al (2017), señalan que existen alrededor de 14 compuestos fenólicos presentes en las hojas de guayusa, de igual manera mediante la aplicación de dos métodos analíticos, DPPH y ORAC, mostraron que esta posee una alta capacidad antioxidante. Jara, et al (2013), muestran que extractos obtenidos con etanol en las hojas de guayusa poseen un alto contenido de flavonoides y fenoles. Villacis, Stinco, Jerves, Ortiz, & Ruales (2017), mediante la aplicación del método DPPH cuantificaron 14 tipos de compuestos fenólicos y 7 tipos de carotenoides, de los cuales el más representativo fue la luteína. Una investigación realizada por Pardau, Pereira, Apostolides, Serema, & Bester, (2017), Señala que el contenido de polifenoles totales presente en la guayusa fluctúa entre 54,39 y 67,23 mg/g. Mediante la aplicación de un método espectrofotométrico encontraron que los principales compuestos presentes en la guayusa son los derivados del ácido cafeoil-quinico. La presencia de las mencionadas moléculas está directamente relacionada a la actividad antioxidante de los extractos de *I. guayusa*.

4.4. PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN BASE A LA NTE INEN 1122:2013

Una vez realizados los dos extractos pulverulentos fue posible determinar algunos parámetros físico-químicos y microbiológicos basados en la normativa NTE INEN 1122:2013, relacionada al café soluble el cual representa el producto presente en el mercado nacional e internacional más similar al objetivo de la presente investigación.

A continuación, se puede apreciar en la tabla 8 la comparación de los parámetros físico-químicos obtenidos analizando los sólidos pulverulentos del presente trabajo y los rangos permitidos por el café soluble.

Tabla 8. Comparación entre algunos datos físico-químicos de los extractos de guayusa y del café soluble.

PARÁMETROS	GUAYUSA		CAFÉ SOLUBLE (NTE INEN 1122)			
	Liofilizado	Spray Drying	Liofilizado		Spray Drying	
			MIN	MÁX	MIN	MÁX
pH	5,56	5,5	4,7	5,5	4,7	5,5
Solubilidad Agua Caliente	30 seg	30 seg	-	30 seg	-	30 seg
Cenizas totales	13,58	13,87	-	14	-	14
Solubilidad Agua Fría	3 min	3 min	-	3 min	-	3 min

En la tabla 8, se puede observar los parámetros físico-químicos de las muestras del preparado hidrosoluble de *I. guayusa* obtenidas por las técnicas de liofilización y *spray drying*, los cuales se encuentran dentro de los requisitos establecidos por la normativa NTE INEN 1122:2013 del café soluble.

Tabla 9. Comparación de la presencia de algunos metales entre los extractos de guayusa y del café soluble.

PARÁMETROS	GUAYUSA		CAFÉ SOLUBLE (NTE INEN 1122)	
	Liofilizado mg/kg	Spray Drying mg/kg	Liofilizado	Spray Drying
			MÁX mg/kg	MÁX mg/kg
Cobre	11,3	12,35	20	20
Plomo	N/D	N/D	1	1
Zinc	69,6	234,5	50	50

N/D – no detectable

En la tabla 9 se pueden apreciar los valores de metales conseguidos al analizar las muestras del sólido pulverulento obtenido por las dos tecnologías. Los valores relacionados al cobre se hallan dentro de los parámetros aceptados por la normativa NTE INEN 1122:2013 del café soluble, mientras que por lo que se refiere al zinc se superan los límites en ambos casos. El plomo presenta valores inferiores al límite de detección del equipo de absorción atómica. no obstante, el zinc supera el límite máximo permisible por la normativa anteriormente

mencionada. Posiblemente los altos valores de zinc se deben a características específicas de los suelos donde se han recolectado las hojas, nuevas investigaciones deberían profundizar este tema.

Tabla 10. Determinación de hierro en los extractos de guayusa y del café soluble.

PARÁMETROS	GUAYUSA	
	Liofilizado mg/kg	Spray Drying mg/kg
Hierro	29,20	19,35

Los resultados de los análisis microbiológicos muestran que los extractos obtenidos, tanto por liofilización como por *spray drying*, no tienen presencia de microorganismos mesófilos, ya que no han crecido colonias en las cajas Petri. Por lo que se refiere a las bacterias coliformes, se han observado colonias de *Salmonella* solo en la muestra obtenida mediante liofilización. Es posible que la presencia de dicha bacteria haya sido debida a una contaminación del equipo liofilizador o a un error del operador.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de extractos de la especie *I. guayusa*, aplicando las técnicas de liofilización y spray drying. El preparado representó un ingrediente para nuevas bebidas funcionales en base a una especie amazónica;
- Las mejores condiciones para maximizar la extracción de cafeína y polifenoles son las que prevén 15 g de droga en 100 ml de agua, llevando a decocción por 30 minutos. La relación sólido-líquido se ha demostrado significativa tanto para la extracción de la cafeína como de los polifenoles. El tiempo no resultó ser significativo por lo que se refiere al contenido de cafeína, es de decir, que al variarlo no se obtenían resultados distintos. Sin embargo, el tiempo sí fue significativo en la determinación de polifenoles totales.
- Las técnicas empleadas en la obtención del sólido pulverulento, mostraron diferencias en el rendimiento; para liofilización se obtuvo un rendimiento en base seca de 9,74% y 7,99% para la técnica *spray drying*. En relación a los parámetros físico-químicos, los valores de cenizas, pH y solubilidad no tienen gran diferencia entre las dos tecnologías, además estos resultados se encuentran dentro del intervalo aceptable propuesto por la normativa NTE INEN 1122:2013 del café soluble, y en los análisis químicos la cantidad de cobre y plomo del preparado hidrosoluble obtenido por las dos técnicas se ubican dentro de los parámetros propuestos por la norma mencionada anteriormente, no obstante el contenido de zinc sobrepasa el límite máximo aceptable;
- En cuanto a los parámetros microbiológicos de la NTE INEN 1122:2013, los dos extractos cumplen con la normativa por lo que se refiere a los mesófilos aerobios, ya que no se registró presencia de estos. Mientras la muestra obtenida por liofilización, no cumple con el límite aceptable de coliformes totales ya que se registró presencia de *Salmonella*.

5.2. RECOMENDACIONES

- Profundizar el estudio del contenido de cafeína y polifenoles de *I. guayusa* en relación a diferentes factores relacionados a la botánica de la especie y a su contexto, como la edad de la planta, su ubicación geográfica (altitud, exposición a la luz, etc.) y las características del suelo. Adicionalmente, es relevante identificar si existe una diferencia entre el contenido de metabolitos secundarios en la primera poda o en rebrotes de la misma rama. Las nuevas informaciones deberían permitir la estandarización de los métodos de recolección aumentando los rendimientos.
- Optimizar con nuevos estudios los parámetros de trabajo de la liofilización y de la técnica *spray drying*.
- Proponer un estudio para profundizar los límites permitidos o aconsejables de la presencia de metales en los extractos sólidos de *I. guayusa*.
- Realizar un análisis de costo de producción con el fin determinar la eficiencia de las dos tecnologías empleadas para la obtención de los sólidos pulverulentos.

CAPÍTULO VI

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, M., & Whitecomb, P. (2016). RSM SIMPLIFIED: Optimizing Processes Using Response Surface Methods for Design of Experiments. *Productivity press*.
- Carrera, L. (6 de Febrero de 2017). Obtenido de Estudio de la Capacidad Antioxidante y Contenido de Polifenoles de la Extracción Etanólica de Hojas de Guayusa Deshidratadas trituradas : http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/16684/1/68836_1.pdf
- Cheng, K., Dong, W., Long, Y., Zhao, J., & Hu, R. (2018). Evaluation of the impact of different drying methods on the phenolic compounds, antioxidant activity, and in vitro digestion of green coffee beans. *Wiley*, 1-10.
- Chianesea, G., Golin, D., Tagliatalata, O., Collado, J., Munoz, E., Appendino, G., & Pollastro, F. (2019). Bioactive triterpenoids from the caffeine-rich plants guayusa and maté. *Food Research International*, 504-510.
- Cobos, A. (13 de Junio de 2017). *Universidad Central Del Ecuador*. Obtenido de Determinación del contenido de cafeína en un cultivo comercial de Ilex guayusa: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12183/1/T-UCE-0004-30-2017.pdf>
- Coronel, G. (2017). Determinación del contenido de cafeína en infusiones de hoja de guayusa (Ilex guayusa) bajo condiciones de secado. *Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el Título de Ingeniería Agroindustrial y de Alimentos*. Universidad de las Américas (UDLA), Quito. Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8381/1/UDLA-EC-TIAG-2017-36.pdf>
- Dueñas, J., Jarrett, C., Cummins, I., & Logan, E. (2016). Amazonian Guayusa (Ilex guayusa Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. *Economic Botany*, 70, 85-91. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s12231-016-9334-2>
- Farkas, Á., Horváth, G., & Molnár, P. (2014). *Pharmacognosy 1*. Pécs: University of Pécs.
- (2013). Fundación Chankuap. *Manual de buenas practicas de la Guayusa*. El aprovechamiento de la Guayusa (Ilex Guayusa), Macas.
- García, D., & Solorzano, S. (22 de Noviembre de 2016). *Revista líderes*. Obtenido de Revista líderes: <https://www.revistalideres.ec/lideres/soda-guayusa-emprendedores-economia-negocios.html>
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2016). *Universidad Politécnica de Valencia*. Obtenido de Determinación de Polifenoles Totales por el Método Folin-Ciocalteu: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>
- García-Ruiz et al. (2017). Guayusa (IlexguayusaL.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *J Sci Food Agric*, 3929–3936.
- Humanante, A., & Caranqui, J. (2011). Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa (Ilex guayusa Loess.) del Cantón Pastaza. *Fundación Runa Tarpuna*, 1-10.

- Obtenido de
http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/767/1/Articulo_Guayusa.pdf
- Jara, A., Rodríguez, Y., Cornejo, J., Cazar, M., Gutierrez, M., & Astudillo, L. (2013). Antioxidant activity and total phenolics of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Researchgate*, 1-6. doi:10.3390/ecsoc-17-b001
- La guayusa, bebida de exportación. (13 de Septiembre de 2018). *El Diario*.
- Massón, A. (25 de Julio de 2019). Guayusacha, un nuevo emprendimiento con sabor a tradición. *Diario los Andes*. Obtenido de <https://diariolosandes.com.ec/guayusacha-un-nuevo-emprendimiento-con-sabor-a-tradicion/#>
- May, J., & Rey, L. (2004). *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical & Biological Products, Revised and Expanded*. Boca Raton: 2nd Edition.
- Medardo, J. (14 de Febrero de 2007). *Ilex guayusa Loes. - Aquifoliaceae*. Obtenido de <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/43618/>
- Melo, V. (2014). Composición y Análisis Químico de la Especie *Ilex guayusa Loes*. *Tesis de grado presentada como requisito*. Universidad San Francisco de Quito, Quito. Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3269/1/000110421.pdf>
- Mondragón, R., Julia, E., Barba, A., & Jarque, J. (2013). El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 52, 159-161.
- NTE INEN 2411. (2017). *BEBIDAS ENERGÉTICAS. REQUISITOS*, 1-4.
- Pardau, M., Pereira, A., Apostolides, Z., Serema, J., & Bester, M. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. *Food & Function*, 4601-4610.
- Parrilla, J. (1957). Tecnología de secado por atomización, nueva línea de desarrollo para el sector cosmético. *INSTALACIONES INDUSTRIALES GRAU S.R.L.*, 20. Obtenido de http://www.e-seqc.org/sites/default/files/2016.09.29_tecnologia_de_secado_por_atomizacion_-_inst_ind_grau_-_jose_parrilla.pdf
- Parzanese, M. (s.f.). Tecnologías para la Industria Alimentaria (Liofilización de alimentos). *Alimentos Argentinos (Una elección natural)*, 1-12. Obtenido de http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_03_Liofilizadores.pdf
- Pérez, K. (2017). Elaboración de una bebida energizante a partir de Guayusa, Pitahaya, Frambuesa, Jackfruit, Mora y Uva Verde edulcorada con Estevia. *Trabajo Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación para la Obtención del Título de Ingeniera Química*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, Quito, Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12655/1/T-UCE-0017-0047-2017.pdf>
- Ponce, J. (2014). Diseño de planta para la elaboración de productos con desechos del procesamiento de Brócoli mediante un proceso de Liofilización. *Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el Título de Ingeniero Agroindustrial y de Alimentos*. Universidad de las Américas. Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/2513/8/UDLA-EC-TIAG-2014-20.pdf>

- ProEcuador. (Agosto-Septiembre de 2016). Obtenido de Boletín Mensual del comercio Exterior: https://issuu.com/pro-ecuador/docs/proec_ic_06_67
- Radice et al. (2016). Ilex guayusa: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. *Mol2Net*, 1-6. doi:10.3390/MOL2NET-02-M
- Radice et al. (2017). The market of Ilex guayusa. Products, stakeholders and trends in the Ecuadorian Amazon Region. *MOL2NET*, 1-8. doi:10.3390/mol2net-03
- Radice, M., & Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, (6), 3-11.
- Rocha, R. (28 de Noviembre de 2018). Obtenido de Determinación del Contenido de Cafeína en un Cultivo Comercial de Guayusa: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14259/1/T-UCE-0004-A60-2018.pdf>
- Saavedra, S. (s.f.). Determinación de la concentración de cafeína en guayusa (Ilex guayusa Loes), en san Ignacio - Cajamarca. *Para obtener el título profesional de: INGENIERO FORESTAL*. Universidad Nacional de Cajamarca, Jaén, Perú. doi:http://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/1715/T016_70095513_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR3R9iot_u4UAzonnr9haxMxdYYEzjbJiLU5yvB-OliStRiR1s0yhlvBPw
- Salvador, N., & Salazar, E. (2014). Evaluación del Efecto anti celulítico de una formulación cosmética a base del extracto alcohólico foliar de Guayusa, Ilex guayusa Loes (Aquifoliaceae). *Tesis previa a la obtención del título de: Magister en Ciencias y Tecnologías Cosméticas*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito Unidad de Postgrado, Quito. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7358/1/QT06124.pdf>
- Santander, D., & Gómez, D. (12 de Octubre de 2018). *Waykana*. Obtenido de <https://www.waykana.com/waykana/debidaenergizante/>
- Santos, D., Colette, A., Sencadas, V., Santos, J., Fernandes, M., & Gomes, P. (20 de Diciembre de 2017). Secado por pulverización: una visión general, biomateriales - Física y química. *Biomaterials - Physics and Chemistry*, 10-28. doi:10.5772 / intechopen.72247.
- Schultes, R. (1979). DISCOVERY OF AN ANCIENT GUAYUSA PLANTATION IN COLOMBIA. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 27(5/6), 143-153. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/41762818>
- Schuster, J., & Mitchell, E. (2018). More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 263-274.
- Siccha, A. (2014). Secado por Atomización (Spray Dryer). *Revista De Química*, 39-44.
- Villacís, J. (2017). Etnobotánica y Sistemas Tradicionales de Salud en Ecuador. Enfoque en la Guayusa (Ilex Guayusa Loes). *Revista Etnobiología.*, 79-88.

- Villacis, J., Stinco, C., Jerves, L., Ortiz, J., & Ruales, J. (2017). Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) indifferent ripening stages . *J Sci Food Agric*, 1927-1937.
- Whitecomb, P., & Oehlert, G. (2007). Graphical Selection of Effects in General Factorials. . *Fall Techn Conf*, 2036.
- Wise, G., & Negrin, A. (01 de Agosto de 2019). A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-13. doi:10.1080/10408398.2019.1643286
- Wise, Graham; Santander, Demetrio. (2018). Comparative Composition Analysis of the Dried Leaves of *Ilex guayusa* (Loes.). *Journal of Food and Nutrition Research*, 638-644.
- Yurkanis, P. (2007). *Fundamentos de la química orgánica*. México: Pearson Educación.
- Zúñiga , W. (2015). "Elaboración de té de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) con la adición de ácido cítrico y edulcorante bajo en calorías". *Trabajo de Graduación. Modalidad: Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. Obtenido de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/15873/1/AL%20584.pdf>

CAPITULO VII

7. ANEXOS



Ilustración 1. Pesado de la materia prima (I. Guayusa)



Ilustración 2. Proceso de Decocción de Guayusa



Ilustración 3. Filtrado del extracto acuoso de la guayusa en Caliente



Ilustración 4. Desprendimiento de cafeína con cloroformo y evaporación del cloroformo



Ilustración 5. Determinación de compuestos fenólicos por el método de Folin Ciocalteu



Ilustración 6. Lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro



Ilustración 7. Proceso de *Spray Drying*



Ilustración 8. Proceso de Ultra congelación y liofilización de la guayusa



Ilustración 9. Medición de pH de producto final (I. Guayusa)



Ilustración 10. Ensayo de Solubilidad en Agua Caliente y Fría